

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年2月1日 (01.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/07475 A1(51) 国際特許分類7:
C07K 14/47, C12N 15/12,
1/21, C12P 21/02, C07K 16/18, A61K 38/18, A61P 5/06,
19/08, A61K 45/00, 48/00, G01N 33/53

(MATSUO, Hisayuki) [JP/JP]; 〒658-0073 兵庫県神戸市東灘区西岡本6丁目4-24, 204号 Hyogo (JP). 南竹義春 (MINAMITAKE, Yoshiharu) [JP/JP]; 〒370-0503 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716番地1 サントリー株式会社 医薬センター内 Gunma (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04907

(22) 国際出願日: 2000年7月24日 (24.07.2000)

(74) 代理人: 弁理士 岩谷 龍 (IWATANI, Ryo); 〒530-0003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番27号 桜橋千代田ビル5階 Osaka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(30) 優先権データ:

特願平11/210002 1999年7月23日 (23.07.1999) JP

特願平11/338841 1999年11月29日 (29.11.1999) JP

特願2000/126623 2000年4月26日 (26.04.2000) JP

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人および

(72) 発明者: 寒川賢治 (KANGAWA, Kenji) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪府箕面市小野原東6丁目28、4-201号 Osaka (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PEPTIDES

(54) 発明の名称: 新規ペプチド

(57) Abstract: Novel peptides compounds inducing the secretion of growth hormone. Peptide compounds or pharmaceutically acceptable salts thereof having an activity of elevating calcium ion concentration in cells which are characterized in that at least one amino acid has been substituted by a modified amino acid and/or a non-amino acid compound.

(57) 要約:

成長ホルモンの分泌を誘導する新規ペプチド系化合物を提供する。
 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくとも一つのアミノ酸が修飾アミノ酸及び/又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

WO 01/07475 A1

明細書

新規ペプチド

5 技術分野

本発明は、ペプチド中のアミノ酸が修飾されていることを特徴とした、細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用あるいは成長ホルモンの分泌誘導活性を有する新規ペプチドに関する。本願発明はまた、当該新規ペプチドの取得方法及び製造方法、該ペプチド及び該ペプチドの前駆体をコードする遺伝子、及び当該遺伝子を用いた該ペプチド及び該ペプチドの前駆体の製造方法に関する。さらに本願発明は、本願発明により開示された新規修飾ペプチドの構造類似体で、成長ホルモン分泌誘導化合物のレセプターに結合して細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用あるいは成長ホルモンの分泌誘導活性を有するペプチド類縁体及びその製造方法に関する。本願発明はまた、該ペプチド若しくは該ペプチド類縁体を有効成分とする医薬用組成物、動物用成長促進剤、又は該ペプチドの抗体若しくはその利用方法に関する。

背景技術

20 成長ホルモン (growth hormone、以下単に GH と略称する) は、下垂体前葉で合成されるタンパク質ホルモンで、骨の成長及び脂肪細胞や軟骨細胞の分化を間接的に促進し、その分泌は、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH; growth hormone-releasing hormone) で促進され、ソマトスタチン (somatostatin) で阻害される [J. Kendrew, et al., Eds., The 25 Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p. 462]。GH は単に成長を促すだけではなく、各種組織でのタ

ンパク質合成の促進、貯蔵脂肪の移動の刺激及び筋肉中のグリコーゲン含量の上昇などの作用もあり、GH 分泌の低下は小人症を、過剰分泌は巨人症又は末端肥大症を惹起する [八杉龍一ら編, 岩波生物学辞典第4版 (岩波書店, 東京, 1997), 757 頁] 。

5 ヒト GH が遺伝子組換え技術によって生産されるようになって以来、GH は上記小人症の治療 [J. O. Jorgensen, Endocr. Rev. 12, 189 (1991)] だけでなく、他の疾患の治療にも用いられ、様々な効果が見いだされた [J. O. Jorgensen, et al., Horm. Res. 42, 235 (1994)] 。例えば、正常人での骨芽細胞及び骨再構成の活性化 [K. Brixen, et al., Miner. Res. 5, 609 (1990)] 、GH 欠乏症成人での筋肉量及び筋力の増強 [R. C. Cuneo, et al., J. Appl. Physiol. 70, 688 (1991)] 、GH 欠乏症成人での運動能力の向上 [R. C. Cuneo, et al., J. Appl. Physiol. 70, 695 (1991)] 、小児の重度火傷治癒 [D. N. Herndon, et al., Ann. Surg. 212, 424 (1990)] 、排卵誘発におけるゴナンドトロピンとの併用 [R. Homburg, et al., Clin. Endocrinol. (Oxf). 32, 781 (1990)] 、プレドニゾン投与によるタンパク質代謝異常の予防 [F. F. Horber and M. W. Haymond, J. Clin. Invest. 86, 265 (1990)] 、重度免疫不全症における T 細胞「教育」の促進 [W. J. Murphy, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 4481 (1992)] 、老人性の体重減少、脂肪組織拡大及び皮膚萎縮を抑制する効果 [D. Rudman, et al., N. Engl. J. Med. 323, 1 (1990)] などがある。

小児の成長促進、及び成人の GH 欠乏に伴う代謝や機能の欠損の正常化に、組換え GH の投与は効果的ではあるが、用量限定期的な副作用があること、経口投与ができないこと及びコスト面で問題がある [B. A. Lefker, et al., in *Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice*, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998),

p. 107-p. 108]。多くの成人患者は、過剰なナトリウムと体液の貯留によると思われる関節痛や手根管症候群のような副作用のため、GH 投与を継続することができない [E. Corpas, et al., *Endocr. Rev.* 14, 20 (1993)]。これらの副作用は、GH 投与によるホルモン分泌の非生理的な 5 パターンと関係しており、GH の投与では正常な GH 分泌の拍動性 (pulsatility) をまねることができない [B. A. Lefker, et al., in *Growth Hormon Secretagogues in Clinical Practoce*, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), p. 107-p. 108]。

10 生体内での GH 分泌の拍動性は、基本的には視床下部由来の 2 つの制御因子の相互作用によって確立される、すなわち GHRH とソマトスタチンが下垂体に作用して GH 分泌を制御している [G. S. Tannenbaum and N. Ling, *Endocrinology* 115, 1952 (1984), R. G. Clark and I. C. Robinson, *Endocrinology* 122, 2675 (1988)]。正常な GH 分泌のパターンは昼夜で 15 異なり、夜間に、より多くの GH がより頻繁に放出される。GH の放出パルスの振幅は、種々のステロイド・ホルモン、神経伝達物質、GH とインシュリン様成長因子によるフィードバック、栄養状態、睡眠及び運動によって、さらに調節される [J. S. Strobl and M. J. Thomas, *Pharmacol. Rev.* 46, 1 (1994)]。

20 上に記載した GH 投与に伴う副作用を克服するために、GH 分泌誘導活性を有する化合物が数多く合成され、GH 分泌誘導物質 (GHS; growth hormone secretagogue) としてその構造活性相関、薬理学、臨床応用が精力的に研究された。まず、GHRP-6 (Growth Hormone-Releasing hexapeptide) などのペプチドが合成され、GH の欠損乃至は低下に起因 25 する治療薬として開発された [C. Y. Bowers, et al., *Endocrinology* 114, 1537-1545 (1984)]。しかし、これらのペプチド化合物は静脈注射でし

か効果を発揮できないので、経口投与可能な低分子量の非ペプチド系化合物が開発され [R. G. Smith, et al., *Science* 260, 1640-1643 (1993)]、第二相臨床試験の段階にまで進んでいるものもある [A. A. Patchett, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7001-7005 (1995)]。

5 細胞における、レセプターのシグナル受容から機能発現に至るまでの一連の情報伝達をシグナル伝達 (signal transduction) というが、G タンパク質と共に役したシグナル伝達系は以下のようないくつかの機構で進行する [八杉龍一ら編、岩波生物学辞典第4版 (岩波書店、東京、1997), 555-556 頁]。この G タンパク質共役系は細胞膜 7 回貫通型レセプターを 10 もち、cAMP をセカンドメッセンジャーとして産生する cAMP 系とイノシトール-1, 4, 5-三リン酸 (IP3) やジアシルグリセロール (DG) イノシトールリン脂質情報伝達系に分けられる。cAMP は cAMP 依存性のキナーゼ (A キナーゼ) を活性化し、機能タンパク質のセリンやトレオニン残基のリン酸化を起こし、活性を修飾する。一方、IP3 は小胞体上の IP3 受 15 容体と結合し、カルシウムイオンの遊離を促し、DG は C キナーゼを活性化してホルモンなどの作用発現を促す。

IP3 や DG をセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達系で、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する機構は以下の如くである [J. Kendrew, et al., Eds., *The Encyclopedia of Molecular Biology* (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p. 136-137]。レセプターへリガンドが結合すると、G タンパク質を介してホスホリバーゼ C が活性化されて、PIP2 から IP3 が生成する。IP3 は細胞内顆粒である ER などの小胞体に貯蔵されているカルシウムイオンを細胞質に放出させ、細胞質中のカルシウムイオン濃度が上昇する。IP3 もしくはカルシウムイオンがさらに細胞質に存在すると、カルシウムは再び小胞体に取り込まれ、細胞質中のカルシウムイオン濃度は低下する。すなわち、レセプターへのリガンド

の結合は、細胞質中のカルシウムイオン濃度の一過性の上昇をもたらす。

GHS は GHRH による GH の分泌及び細胞内 cAMP レベルの上昇に協奏的に作用すること [K. Cheng, et al., *Endocrinology* 124, 2791-2798 (1989)]、及び GHRH のレセプターへの結合は cAMP をセカンドメッセンジ

5 ャーとして産生するのに対して、GHS は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇をもたらすことから、GHS の作用機作は GHRH のそれとは異なることが示唆され [J. Herrington and B. Hille, *Endocrinology* 135, 1100-1108 (1994).] 、GHS は GHRH が結合する GHRH レセプターとは異なるレセプターに結合することが想定された。実際に GHS が結合するレセ
10 プター遺伝子がクローニングされ、ノザン解析の結果から GHS レセプター (GHS-R) は視床下部及び脳下垂体で発現していること、及びブタとヒト由来の GHS-R のアミノ酸配列が 90%以上の同一性を示すことがわかつた [A. D. Howard, et al., *Science* 273, 974-977 (1996)]。しかし、GHS-R に結合する内在性のリガンドは単離されておらず、この GHS-R は
15 リガンドが不明なオーファン・レセプターであった。

タンパク質のアミノ末端又はタンパク質を構成するアミノ酸残基の側鎖に、ミリスチン酸、ゲラニル酸、パルミトイル酸、又はファルネシル酸などの脂肪酸が結合することがあるが、これらの脂肪酸の役割はこれらの脂肪酸修飾タンパク質を細胞膜にアンカーリング (anchoring) する

20 ことにある [J. Kendrew, et al., Eds., *The Encyclopedia of Molecular Biology* (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p. 616]。これらの脂肪酸修飾タンパク質において、脂肪酸はシステイン残基に S-アシル結合で結合しており、本願発明によって開示された内在性の GHS のようにセリン残基に O-アシル結合で脂肪酸が結合したアミノ酸、この脂肪酸修
25 飾アミノ酸を含むタンパク質及びペプチドは全く知られていなかった。また、脂肪酸で修飾されたアミノ酸を含むペプチドが、いかなるレセプ

ターのリガンドとして機能することも知られていなかった。

発明の開示

本発明を詳細に説明するに先立ち、用語を以下のように定義する。

5 ペプチドとは、複数のアミノ酸がペプチド結合で連なった化合物のことである。ここでアミノ酸(又はアミノ酸残基とも表現する)とは、アミノ酸の一般式； $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{R}')\text{-COOH}$ において、R'が天然に存在する置換基を有する天然アミノ酸の他、そのD,L-光学異性体等を含む。

10 天然アミノ酸が修飾アミノ酸(又は修飾アミノ酸残基と表現する)で置換されている場合もある。修飾アミノ酸は、上記一般式の置換基R'がさらに修飾されたアミノ酸及びそのD,L-光学異性体ばかりではなく、例えば上記一般式の置換基R'において、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド、カルバミド又はチオカルバミド等を介して又は介さずに、様々な置換基が結合した非天然アミノ酸も含む。また、アミノ酸のアミノ基に低級アルキル基が置換されている非天然アミノ酸も含まれる。

15 ペプチド類縁体とは、ペプチドにおいて少なくとも1つのアミノ酸が非アミノ酸化合物で置換された化合物のことをいい、従って当該置換化合物のペプチド類縁体への少なくとも1つの結合はペプチド結合ではない。

また、これらペプチド及びペプチド類縁体のアミノ末端及び/又はカルボキシル末端が修飾された化合物を誘導体とし、ペプチド、ペプチド類縁体及びそれらの誘導体を総称してペプチド系化合物とした。

20 配列番号2記載のアミノ酸配列において少なくともアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列とは、以下に掲げる配列をいう。
Gly Ser Ser Phe,

Gly Ser Ser Phe Leu,
Gly Ser Ser Phe Leu Ser,
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro,
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu,
5 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His, 又は,
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln.

GHS レセプターに結合して細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるか、又は GH 分泌を誘導する活性を有する内在性のリガンド、すなわち内在性 GHS の発見及び利用方法が所望されていた。さらに、当該内在性 GHS 10 の構造類似体で、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるか、又は GH 分泌誘導活性を有する化合物が望まれていた。また、当該内在性 GHS 又はその構造類似化合物を含有し、GH の拍動的な分泌を誘導することによって GH 投与による副作用のない医薬組成物あるいは動物の成長を促進 15 するための組成物、及び当該組成物を用いた治療方法が所望されていた。

本願発明者らは、GHS レセプター (GHS-R) へのリガンドの結合がイノシトールリン脂質をセカンドメッセンジャーとして細胞内カルシウムイオン濃度の一過性の上昇をもたらすことに着目し、GHS-R を発現させた CHO 細胞 (CHO-GHSR62) において細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性 (Ca 上昇活性) を指標に、各種臓器又は組織の抽出物をスクリーニングした。その結果、ラット胃の抽出物に強い Ca 上昇活性があることを見いだし、当該抽出物より各種クロマトグラフィーを用いて Ca 上昇活性を有する物質を精製して、該物質が脂肪酸で修飾された分子量約 3,000 の新規ペプチドであることを見いだした。さらに当該新規ペプチドが、下垂体前葉細胞からの GH の特異的な分泌を促進することを確認して、該新規ペプチドが GHS-R の内在性のリガンド、すなわち内在性 GH 20 25

分泌誘導物質（内在性 GHS）であることを見出した。すなわち、本願発明の第一は、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性又は GH 分泌誘導活性を有し、構成アミノ酸残基が脂肪酸で修飾されていることを特徴とする内在性の GH 分泌誘導ペプチド、及び該ペプチドの取得方法である。

本願発明者らは、該内在性 GH 分泌誘導ペプチドの構造を詳細に解析し、該ペプチドが配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであり、アミノ末端から 3 番目のセリン側鎖の水酸基が脂肪酸でアシル化されていることを見出した。またラットと同様、強い Ca 上昇活性が存在するヒト胃抽出物中からも、ラット由来の GH 分泌誘導ペプチドと同様の方法で精製及び構造解析を行った結果、ヒト由来の内在性 GH 分泌誘導ペプチドも配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなり、アミノ末端から 3 番目のセリン側鎖の水酸基が脂肪酸でアシル化されていることがわかった。ラット及びヒト由来の内在性 GH 分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列を比較すると全体で 89% の高い同一性を示した。

より詳しくは、ラットとヒトではアミノ末端から 10 番目までのアミノ酸配列及び 13~28 番目のアミノ酸配列は同一であるが、11 番目と 12 番目のアミノ酸がラットでリジン、アラニンであり、ヒトでこれらがそれぞれアルギニン、バリンに置換されている点で相違している。ラット由来の内在性 GH 分泌誘導ペプチドを各種プロテアーゼで切断し、精製したペプチド断片の Ca 上昇活性を測定した結果、アミノ末端から 7 番目までのアミノ酸配列からなるペプチドが Ca 上昇活性を有する最小のペプチドであった。

さらに、化学合成したペプチドの Ca 上昇活性の測定などから、Ca 上昇活性発現に必須のコア配列は配列番号 8 に記載の 4 アミノ酸からなる配列であることがわかった。また、ラット以外のヒト、ブタ、ウシから分

離した内在性 GH 分泌誘導ペプチド (28 アミノ酸) およびこれらのペプチドから 1 つグルタミンが欠失した内在性 GH 分泌誘導ペプチド (27 アミノ酸) のいずれにおいても、配列番号 9 に記載の 10 アミノ酸からなる配列が保存されていた。

5 すなわち、本願発明の第 2 は、配列番号 8 に記載のアミノ酸配列、望ましくは配列番号 1 に記載のアミノ酸配列、より望ましくは配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を Ca 上昇活性発現に必須のコア配列として含む脂肪酸修飾ペプチドである。

なお、ニワトリ、ウナギ、カエルからも内在性 GH 分泌誘導ペプチドが 10 単離され、配列番号 8 に記載の 4 アミノ酸からなるコア配列を有していることがわかった。

一方、カエルからもラットの内在性 GH 分泌誘導ペプチドと非常に類似性の高い内在性 GH 分泌誘導ペプチドが単離された。

さらに、アフリカツメガエル、ニジマス、イヌからも内在性 GH 分泌誘導ペプチドが単離された。なお、ニジマスからは、23 アミノ酸からなるグレリン-23 と、20 アミノ酸からなるグレリン-20 とが単離された。

なお、ウナギのグレリン、ニジマスのグレリン-23 およびグレリン-20 のカルボキシル基末端のアミノ酸はアミド化されていた。

20 また、アフリカツメガエルの内在性 GH 分泌誘導ペプチドはアミノ末端から 3 番目のアミノ酸残基がトレオニンであったことから、本発明は、配列番号 8 に記載のアミノ酸配列、望ましくは配列番号 1 に記載のアミノ酸配列、より望ましくは配列番号 9 に記載のアミノ酸配列のアミノ末端から 3 番目のアミノ酸残基セリンをトレオニンに変換したペプチドを 25 Ca 上昇活性発現に必須のコア配列として含む脂肪酸修飾ペプチドにも関する。

本願発明によって開示された GH 分泌誘導活性をもつ内在性脂肪酸修飾ペプチド又は上記コア配列からなる脂肪酸修飾ペプチドは、Ca 上昇活性を有する化合物の設計指針も提供する。

すなわち、本発明の第三は、当該脂肪酸修飾ペプチドの構造類似化合物を合成し、該構造類似化合物の Ca 上昇活性を確認することにより、Ca 上昇活性を有する新規化合物を取得することである。従って、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチド又はペプチド類縁体において、構成アミノ酸が修飾アミノ酸又は非アミノ酸化合物で置換された化合物も本願発明に属することはいうまでもない。

10 内在性 GH 分泌誘導ペプチドをコードする cDNA を常法により取得した。配列番号 4 及び 5 に記載したアミノ酸配列に示された如く、ラット及びヒトの cDNA はいずれも 117 アミノ酸からなり、アミノ末端から 24 番目ないし 51 番目まで 28 アミノ酸の配列がラット及びヒトの内在性 GH 分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列と各々一致した。すなわち、内在性 GH 分泌誘導ペプチドは 117 アミノ酸からなる前駆体ペプチドとして合成され、アミノ末端側の 23 アミノ酸からなるシグナルペプチドが切断を受け、さらにカルボキシル末端側の 56 アミノ酸が切断除去されて GH 分泌誘導活性をもつ脂肪酸修飾ペプチドが生成することが明らかになった。また、ブタからも 28 アミノ酸からなる内在性 GH 分泌誘導ペプチドの前駆体を 15 コードする cDNA が見いだされた。

20 25 さらに、ブタからも 27 アミノ酸からなる内在性 GH 分泌誘導ペプチドの前駆体をコードする cDNA が見いだされた。

また、ウシからも 27 アミノ酸からなる内在性 GH 分泌誘導ペプチドの前駆体をコードする cDNA が部分的であるが見いだされた。

またさらに、ウナギ、アフリカツメガエル、ニジマスからも内在性 GH 分泌誘導ペプチドの前駆体をコードする cDNA が見いだされた。なお、二

ジマスからは、23アミノ酸からなるグレリン-23の前駆体をコードするcDNAと、20アミノ酸からなるグレリン-20の前駆体をコードするcDNAとが単離された。

従って、本願発明の第4は、内在性GH分泌誘導ペプチドの前駆体をコードするcDNA及び当該cDNAを用いたCa上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチド又はペプチド類縁体の原料となるペプチドの製造方法である。

ラット胃抽出物から28アミノ酸で構成される内在性GH分泌誘導ペプチド（グレリン）を精製する際に、マイナー画分として回収されるペプチドを解析したところ、グレリンの13番目若しくは14番目のグルタミンが1つ欠失した27アミノ酸からなるペプチド（グレリン-27）を見いだした。グレリン-27は28アミノ酸からなるグレリンと全く同様のCa上昇活性およびGH分泌誘導活性を有しており、内在性のGH分泌誘導ペプチドであるから、該グレリン-27も本発明に属する。

グレリンの13番目および14番目のグルタミンをコードしている塩基配列は、gca gcaでありmRNAのスプライシング（splicing）が起こるエクソンの末端の配列であり、異ったスプライシングが起こることにより、2つのグルタミンのコドンのうち1つが脱落したcDNAが生成する可能性が示唆された。実際にラット及びヒトのcDNAライブラリーを探索したところ、27アミノ酸からなるグレリン-27の前駆体ペプチドをコードするcDNAが見つかった。

すなわち、ラットおよびヒトのグレリン-27ペプチドは、配列番号12又は13に記載した116アミノ酸からなる前駆体ペプチドとして合成され、アミノ末端側の23アミノ酸からなるシグナルペプチドが切断を受け、さらにカルボキシル末端側の56アミノ酸が切断除去されて27アミノ酸からなるGH分泌誘導活性をもつ脂肪酸修飾ペプチドとして生成することが明らかになった。

また、ブタおよびウシからもグレリン-27 ペプチドの前駆体をコードする cDNA が見いだされ、これらの動物においてもグレリン-27 およびその前駆体の存在が確認された。

すなわち、配列番号 10, 11, 17 および 22 記載のアミノ酸配列 5 からなるグレリン-27 ペプチド、及び配列番号 12, 13, 19 および 23 記載のアミノ酸配列を有するグレリン-27 前駆体ペプチド、並びに配列番号 14, 15, 21、および 24 に記載の塩基配列を有する該前駆体ペプチドをコードする cDNA も本発明に属することはいうまでもない。

本願発明で開示された Ca 上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチド又は 10 Ca 上昇活性を有するペプチド類縁体等のペプチド系化合物は、GH の欠損又は低下に起因する疾患を治療するための医薬組成物も提供する。該医薬組成物は GH の投与が有効である全ての疾患に用いることができ、GH の投与によって生じる様々な副作用を克服することができる。また、該医薬組成物は動物の成長促進剤などの動物用薬剤としても用いることができる。 15

本発明に係るペプチド系化合物は脳室内投与および静脈内投与によって食欲増進作用があることから、食欲不振や拒食症を治療するための食欲増進剤として用いることができる。また、運動および胃酸分泌を促進する作用があることから、非潰瘍性消化不良、突発性軽症胃アトニー、 20 機能性消化不良および逆流性食道炎等の胃機能性疾患の治療剤として用いることもできる。さらに、静脈内投与により骨髓、十二指腸および空腸において細胞増殖促進作用が認められたことから、腸管粘膜保護剤、経静脈栄養時の小腸粘膜障害予防剤及び骨粗鬆症治療剤として用いることもできる。

25 本願発明で開示された Ca 上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを抗原として調製された抗体、当該抗体を用いた内在性 GH 分泌誘導ペプチド

の測定方法、及び該抗体を具備した測定キットも本願発明に属する。

また、グレリンのアミノ末端側及びカルボキシル末端側のペプチドに対する抗体を作成し、前者が 3 位セリンを修飾している脂肪酸を特異的に認識することを利用して、脂肪酸で修飾されたグレリンと脂肪酸が脱離したグレリンとを分別定量することができるアッセイ方法、およびグレリンのアミノ末端側ペプチドに対する抗体とカルボキシル末端側のペプチドに対する抗体とを組み合わせた検査キットも本願発明に属する。

すなわち本願発明は、アシル化セリンという新規修飾アミノ酸を有する新規ペプチドホルモンを提供し、又当該ペプチドの構造を基本骨格とする Ca 上昇活性有する化合物の新規設計指針をも提供する。

さらに、本願発明によって開示された脂肪酸修飾ペプチド、GH 放出ホルモン及びソマトスタチンによる GH 分泌誘導機構の解明は、単に GH 分泌誘導機構に限らず他のホルモン分泌制御機構にも敷衍することが示唆される。本願発明は、脂肪酸修飾ペプチドの循環器系および代謝系の制御因子としての多様な機能を開示するものであり、本願発明の効果は新しい生体制御機構の解明にも及ぶものである。

具体的には本発明は

(1) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチドの少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されていることを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(2) (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は (b) 当該配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつ該アミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記 (1) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(3) 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22 および 23 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記 (2) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

5 (4) 配列番号 25、26、29、30、31、32、34 および 35 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記 (2) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

10 (5) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドの (a) 構成アミノ酸が修飾されているか又はされていない、かつ (b) 少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換されているか又はされていないペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

15 (6) 配列番号 27、28 および 33 記載のアミノ酸配列を有する前記 (1) 又は (5) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

20 (7) (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は (b) 当該配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記 (5) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

25 (8) 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22 および 23 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記 (7) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(9) 配列番号 25、26、29、30、31、32、34 および 35 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記(7)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

5 (10) アミノ末端の1番目から4番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が、下記の式で表される前記(1)又は(5)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

A - B - C - D -

A ; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

10 B ; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

(ただし、A + B の分子鎖長がジペプチド相当長ある。)

C 又は D ; 同一であっても異なっていてもよく、(a) 修飾されたアミノ酸、又は (b) 疎水性側鎖を有するアミノ酸、
を表す、

15 (11) C が、アミノ酸の α 炭素に、(a) 炭素数 1 以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエーテル、アミドまたはジスルフィド結合を介して炭素数が 1 若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は (b) 炭素数 1 以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸であり、D が疎水性側鎖を有するアミノ酸
20 であることを特徴とする前記(10)に記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(12) 配列番号 2、3、9、10、11、16、17、22、25、
26、27、28、29、30 および 31 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列において、アミノ末端の1番目から4番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が前記(10)または(11)に記載のペプチド系化合物であるペプチド系化合物又はそ

の薬学的に許容される塩、

(13) 修飾されたアミノ酸がアミノ末端から3番目のアミノ酸である前記(1)、(2)、(3)、(5)、(7)または(8)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

5 (14) 修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシスティンであることを特徴とする前記(13)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(15) アミノ酸の α 炭素に、(a)炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、ア10ミド又はカルバミド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(b)H又は炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸を含有する前記(1)、(2)、(3)、(5)、(7)または(8)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

15 (16) 修飾アミノ酸が、アミノ酸の α 炭素に、(a)炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、ジスルフィド、アミド、カルバミド又はチオカルバミド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(b)炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入したア20ミノ酸である前記(1)、(2)、(4)、(5)、(6)、(7)、(9)、(10)または(12)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(17) エステル結合により修飾された修飾アミノ酸を有する前記(1、2、3、5、7または8)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

25 (18) アミノ酸の側鎖の官能基がエステル結合を形成することにより修飾された修飾アミノ酸を有する前記(1)、(2)、(4)、(5)、(6)、

(7)、(9)、(10)、(11) または (12) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(19) アミノ酸の側鎖の水酸基に脂肪酸がエステル結合したアミノ酸を有する前記 (17) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(20) 脂肪酸が、アミノ酸の側鎖の水酸基にエステル結合又はメルカプト基にチオエステル結合したアミノ酸を有する前記 (18) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(21) 炭素数が 2 乃至 35 である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記 (19) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(22) 脂肪酸が炭素数 2 乃至 35 である前記 (20) のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(23) 炭素数が 2、4、6、8、10、12、14、16 および 18 の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記 (21) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(24) 脂肪酸が炭素数 2、4、6、8、10、12、14、16 および 18 の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸である前記 (22) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(25) 結合した脂肪酸がオクタン酸 (octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記 (23) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(26) 脂肪酸がオクタン酸 (octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記 (24) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(27) 結合した脂肪酸がデカン酸 (decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記 (23) 記載のペプチ

ド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(28) 脂肪酸がデカノン酸 (decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記 (24) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

5 (29) 前記 (1) 乃至 (28) 記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端に、更に塩基性アミノ酸が結合していることを特徴とするペプチド系化合物、

(30) N 末端が炭素数 1 以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシル基により修飾され及び／又は C 末端のカルボキシル基の OH が OZ 又は
10 NR2R3 (Z は薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、R2 及び R3 は H 及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す) であることを特徴とする前記 (1), (2), (3), (5), (7), (8), (13), (14), (15), (17), (19), (21), (23), (25), (27) 項記
15 載のペプチド系化合物、

(31) アミノ末端のアミノ基が、炭素数 1 以上の飽和あるいは不飽和アルキル基又はアシル基の導入により修飾され及び／又はカルボキシル末端のカルボキシル基の OH が OZ 又は NR2R3 (Z は薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基を示し、R2 及び R3 は H 及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す、) であることを特徴とする前記 (1), (2), (4), (5), (6), (7), (9), (10), (11), (12), (16), (18), (20), (22), (24), (26), (28), (29) 項記載のペプチド系化合物、

25 (32) 前記 (30) または (31) 記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端アミド誘導体に、更に塩基性基を導入したことを特徴とする

ペプチド系化合物、

(33) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物、

(34) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物、

(35) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための医薬組成物、

(36) ヒト以外の動物に適用するための前記(33)乃至(35)記載の医薬組成物、

(37) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(38) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、

(39) ヒト以外の動物に適用するための前記(37)又は(38)記載の治療方法、

(40) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAであって、当該DNAがコードするアミノ酸配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする塩基配列を有する当該DNA、

(41) 塩基配列が、配列番号6、7、14、15、20、21、24、

36、37、38および39記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列である前記(40)記載のDNA、

(42) 塩基配列が、配列番号6、7、14、15、20、21、24、

36、37、38および39記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列中、アミノ酸をコードしている塩基配列である前記(40)記載のDNA、

(43) 前記(40)乃至(42)記載のDNAを有するベクター、

(44) 前記(43)記載のベクターを含有する細胞、

(45) 前記(40)乃至(42)記載のDNAを有するベクターを有し、

10 且つ当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されたペプチド系化合物として產生することができる細胞、

(46) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物に対する抗体、

15 (47) 前記(46)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物のアッセイ方法、

(48) 前記(46)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物の検出用キット、

20 (49) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(40)乃至(42)記載のDNAを含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物の製造方法、

(50) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(40)乃至(42)記載のDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物の製造方法、

(51) 前記(19)乃至(28)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、脂肪酸をアミノ酸の側鎖の水酸基にエステル結合又はメルカプト基にチオエステル結合させる活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記(19)乃至(28)記載のペプチド系化合物の製造方法、

(52) 配列番号8記載のアミノ酸配列中のセリンの側鎖の水酸基に脂肪酸をエステル結合させるセリンアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記(19)乃至(28)記載のペプチド系化合物の製造方法、

(53) 配列番号28記載のアミノ酸配列中のトレオニンの側鎖の水酸基に脂肪酸をエステル結合させるアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記(19)乃至(28)記載のペプチド系化合物の製造方法、

(54) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、

(55) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配

列をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして產生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

5 (56) 前記 (1) 乃至 (32) 記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA を含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、および

10 (57) 前記 (1) 乃至 (32) 記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして產生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、

15 20 に関する。

また具体的には、本発明は、

(1) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチドの少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されていることを特徴とするペプチド系化合物又は
25 その薬学的に許容される塩、

(2) (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は (b) 当該配列において

少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつ該アミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記（1）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

5 (3) 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、
17、18、19、22、23、25 及び 26 記載のアミノ酸配列から
なる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記（2）記載の
ペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

10 (4) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモン
の分泌を誘導する活性を有するペプチドの（a）構成アミノ酸が修飾され
ているか又はされていない、かつ（b）少なくともひとつのアミノ酸が非
アミノ酸化合物により置換されているか又はされていないペプチド系化
合物又はその薬学的に許容される塩、

15 (5) 配列番号 27 記載のアミノ酸配列を有する前記（1）又は（4）
記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

20 (6) (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は（b）当該配列において
少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有
し、かつアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列以外の
部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付
25 加されたアミノ酸配列を含む前記（4）記載のペプチド系化合物又はそ
の薬学的に許容される塩、

(7) 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、
17、18、19、22、23、25 及び 26 記載のアミノ酸配列から
なる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記（6）記載の
ペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(8) アミノ末端の 1 番目から 4 番目に至るまでのアミノ酸配列に相当

する部分が、下記の式で表される前記（1）又は（4）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

A - B - C - D -

A ; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

5 B ; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

（ただし、A + B の分子鎖長がジペプチド相当長ある。）

C 又は D ; 同一であっても異なっていてもよく、（a）修飾されたアミノ酸、（b）疎水性側鎖を有するアミノ酸、又は（c）塩基性側鎖を有するアミノ酸、

10 を表す、

（9）配列番号 2、3、8、9、10、11、16、17、22、25 及び 26 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列において、アミノ末端の 1 番目から 4 番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が前記（8）に記載のペプチド系化合物であるペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

15 （10）修飾アミノ酸が、アミノ酸の α 炭素に、（a）炭素数 1 以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、ジスルフィド、アミド、カルバミド又はチオカルバミド結合を介して炭素数が 1 若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、 又は（b）炭素数 1 以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入したア 20 ミノ酸である前記（1）乃至（9）記載のペプチド系化合物又はその薬 学的に許容される塩、

（11）アミノ酸の側鎖の官能基がエステル結合を形成することにより 修飾された修飾アミノ酸を有する前記（1）乃至（10）記載のペプチ 25 ド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（12）アミノ酸の側鎖の水酸基又はメルカプト基に、脂肪酸がエステ

ル結合したアミノ酸を有する前記（11）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（13）脂肪酸が炭素数2乃至35である前記（12）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

5 （14）脂肪酸が炭素数2、4、6、8、10、12、14、16および18の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸である前記（12）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（15）脂肪酸がオクタン酸（octanoic acid）、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記（12）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

10 （16）脂肪酸がデカン酸（decanoic acid）、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記（12）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（17）アミノ末端のアミノ基が、炭素数1以上の飽和あるいは不飽和アルキル基又はアシリル基の導入により修飾され及び／又はカルボキシリ

末端のカルボキシリ基のOHがOZ又はNR₂R₃（Zは薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基を示し、R₂及びR₃はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す。）であることを特徴とする前記（1）乃至

20 （16）記載のペプチド系化合物、

（18）前記（1）乃至（16）記載のペプチド系化合物のカルボキシリ末端に、更に塩基性アミノ酸が結合していることを特徴とするペプチド系化合物、

（19）前記（1）乃至（16）、又は（18）記載のペプチド系化合物25のカルボキシリ末端アミド誘導体に、更に塩基性基を導入したことを特徴とするペプチド系化合物、

(20) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物、

(21) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物、

(22) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための医薬組成物、

10 (23) ヒト以外の動物に適用するための前記(20)乃至(22)記載の医薬組成物、

(24) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

15 (25) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、

20 (26) ヒト以外の動物に適用するための前記(24)又は(25)記載の治療方法、

(27) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAであって、当該DNAがコードするアミノ酸配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする塩基配列を有する当該DNA、

25 (28) 塩基配列が、配列番号6、7、14、15、20、21および24記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列である前記

(27) 記載のDNA、

(29) 塩基配列が、配列番号6、7、14、15、20、21および24記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列中、アミノ酸をコードしている塩基配列である前記(27)記載のDNA、

5 (30) 前記(27)乃至(29)記載のDNAを有するベクター、

(31) 前記(30)記載のベクターを含有する細胞、

(32) 前記(27)乃至(29)記載のDNAを有するベクターを有し、且つ当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されたペプチ10ド系化合物として產生することができる細胞、

(33) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物に対する抗体、

(34) 前記(33)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物のアッセイ方法、

15 (35) 前記(33)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物の検出用キット、

(36) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(27)乃至(29)記載のDNAを含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物の製造方法、

20 (37) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(27)乃至(29)記載

の DNA を含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする前記（1）乃至（19）記載のペプチド系化合物の製造方法、

5 (38) 前記（12）乃至（16）記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、アミノ酸の側鎖の水酸基又はメルカプト基に、脂肪酸をエステル結合させる活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記（12）乃至（16）記載のペプチド系化合物の製造方法、

10 (39) 配列番号8記載のアミノ酸配列中のセリンの側鎖の水酸基に脂肪酸をエステル結合させるセリンアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記（12）乃至（16）記載のペプチド系化合物の製造方法、

(40) 前記（1）乃至（19）記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA を含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、

15 (41) 前記（1）乃至（19）記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして產生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

20

25

(42) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、および、

(43) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして產生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、

にも関する。

15 また、具体的には、本発明は

(1) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

20 (2) 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列において少なくともアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記(1)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

25 (3) 配列番号3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、

17、18、19、22および23記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記(2)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

5 (4) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有し、(a)構成アミノ酸が修飾されているか又はされていない、かつ(b)少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換されているか又はされていないペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

10 (5) 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列において少なくともアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び/又は付加されたアミノ酸配列を含む前記(4)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

15 (6) 配列番号3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22および23記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記(4)乃至(5)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

20 (7) 修飾されたアミノ酸がアミノ末端から3番目のアミノ酸である前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(8) 修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシステインであることを特徴とする前記(7)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

25 (9) アミノ酸の α 炭素に、(a)炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミ

ド又はカルバミド結合を介して炭素数が 1 若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は (b) H 又は炭素数 1 以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸を含有する前記 (1) 乃至 (6) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

5 (10) エステル結合により修飾された修飾アミノ酸を有する前記 (1) 乃至 (6) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(11) 脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記 (10) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(12) 炭素数が 2 乃至 3 5 である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する
10 前記 (11) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(13) 炭素数が 2、 4、 6、 8、 10、 12、 14、 16 および 18 の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記 (12) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(14) 結合した脂肪酸がオクタン酸 (octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記 (13) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(15) 結合した脂肪酸がデカン酸 (decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記 (13) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

20 (16) アミノ末端が炭素数 1 以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシリル基により修飾され及び／又はカルボキシル末端のカルボキシル基の OH が OZ 又は NR2R3 (Z は薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、 R2 及び R3 は H 及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す) であることを特徴とする前記 (1) 乃至 (15) 項記載のペプチド系化合物、

(17) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物、

(18) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物、

(19) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる当該疾患を治療するための医薬組成物、

(20) ヒト以外の動物に適用するための前記(17)乃至(19)記載の医薬組成物、

(21) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(22) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる当該疾患の治疗方法、

(23) ヒト以外の動物に適用するための前記(21)乃至(22)記載の治療方法、

(24) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物に係るDNAであって、当該DNAの塩基配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする塩基配列を有する当該DNA、

(25) 配列番号6、7、14、15、20、21および24記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列を有する前記(24)記載のDNA、

(26) 配列番号6、7、14、15、20、21および24記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列のうち、アミノ酸をコードしている部分の配列を有する前記(24)記載のDNA、

(27) 前記(24)乃至(26)記載のDNAを有するベクター、

5 (28) 前記(27)記載のベクターを含有する細胞、

(29) 前記(24)乃至(26)記載のDNAを有するベクターを有し、且つ当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されたペプチド系化合物として產生することができる細胞、

10 (30) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物に対する抗体、

(31) 前記(30)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物を同定することを特徴とする当該ペプチド系化合物のアッセイ方法、

15 (32) 前記(30)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする当該ペプチド系化合物の検出用キット、

20 (33) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(24)乃至(26)記載のDNAを含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる当該方法、

25 (34) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(24)乃至(26)記載のDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化

学的に修飾することを特徴とする当該方法、

(35) 前記(11)乃至(15)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、配列番号8記載のアミノ酸配列中のセリン残基に脂肪酸が結合したペプチドとして產生することができる5細胞を用いることを特徴とする製造方法、

(36) 前記(4)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取することを特徴とする、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘10導する活性を有するペプチド系化合物の製造方法、

(37) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたア15ミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、

(38) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして產生することができる生体内20の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(39) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又25

は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、および、

(40) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして產生することができる生体内的細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、

10 にも関する。

また、具体的には、本発明は、

(1) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(2) 配列番号1記載のアミノ酸配列を有する前記(1)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(3) 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から7番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記

20 (1)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(4) 配列番号3記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から7番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記

25 (1)記載のペプチド類縁体又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、

(5) 配列番号4記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から28番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(3)記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物、

5 (6) 配列番号5記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から28番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(4)記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物、

10 (7) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

15 (8) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換された前記(7)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(9) 配列番号1記載のアミノ酸配列を有する前記(7)乃至(8)記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、

20 (10) 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から7番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(7)乃至(8)記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、

25 (11) 配列番号3記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から7番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前

記（7）乃至（8）記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、

（12）配列番号4記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から28番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記（10）記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物、

（13）配列番号5記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から28番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記（11）記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物、

（14）修飾されたアミノ酸がアミノ末端から3番目アミノ酸である前記（1）乃至（6）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（15）修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシステインであることを特徴とする前記（14）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（16）修飾アミノ酸における修飾が、アミノ酸の α 炭素において、（a）炭素数1以上のアルキル鎖を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から選択される結合様式で結合する炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は（b）H又は炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を示す前記（1）乃至（6）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（17）エステル結合により修飾された修飾アミノ酸を有する前記（1）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（18）脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記（17）記載のペプチ

ド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(19) 炭素数が2乃至35である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する

前記(18)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(20) 結合した脂肪酸がカブリル酸 (caprylic acid)、又はそのモノ

5 エン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(18)記載のペプ

チド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(21) 結合した脂肪酸がカブリン酸 (capric acid)、又はそのモノエ

ン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(18)記載のペプチ

ド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

10 (22) 結合した脂肪酸がラウリン酸 (lauric acid)、又はそのモノエ

ン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(18)記載のペプチ

ド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(23) アミノ末端が炭素数1以上の飽和あるいは不飽和アルキル又は

アシリル基により修飾され及び/又はカルボキシリル末端がOZ又はNR2R3(Z

15 は薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル

基、R2及びR3はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる

群から選択される互いに同一又は異なる基を示す)により修飾されたこ

とを特徴とする前記(1)乃至(22)項記載のペプチド系化合物、

(24) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的

20 に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因す

る疾患を治療するための医薬組成物、

(25) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、

前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容さ

れる塩を含有することからなる当該疾患を治療するための医薬組成物、

25 (26) ヒト以外の動物に適用するための前記(24)乃至(25)記

載の医薬組成物、

(27) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

5 (28) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、
前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容さ
れる塩を含有する医薬組成物を投与することからなる当該疾患の治療方
法、

(29) ヒト以外の動物に適用するための前記(27)乃至(28)記
載の治療方法、

10 (30) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物に係るDNAであ
って、当該DNA配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる
認識配列を有するペプチドをコードするDNA配列を有する当該DNA、

(31) 配列番号6記載のDNA配列を有する前記(30)記載のcDNA
(NCR含む)

15 (32) 配列番号6記載のDNA配列における31番目から381番目ま
でのDNA配列を有する前記(30)記載のcDNA(NCR含まない)、

(33) 配列番号7記載のDNA配列を有する前記(30)記載のcDNA
(NCR含む)、

20 (34) 配列番号7記載のDNA配列における34番目から385番目ま
でのDNA配列を有する前記(30)記載のcDNA(NCR含まない)、

(35) 前記(30)乃至(34)記載のDNAを有するベクター、

(36) 前記(35)記載のベクターを含有する細胞、

25 (37) 前記(30)乃至(34)記載のDNAを有するベクターを有し、
且つ当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、
当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識
配列を有するペプチド系化合物として產生することができる細胞、

(38) 前記(1)乃至(23)記載のペプチド系化合物に対する抗体、
(39) 前記(38)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(23)記載のペプチド系化合物を同定することを特徴とする当該ペプチド系化合物のアッセイ方法、
5 (40) 前記(38)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(23)記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする当該ペプチド系化合物の検出用キット、
(41) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(30)記載のDNAを含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる当該方法、
10 (42) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(30)記載のDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする当該方法、
15 (43) 前記(18)乃至(22)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、配列番号1記載のアミノ酸配列中のセリン残基に脂肪酸が結合したペプチドとして產生することができる細胞を用いることを特徴とする製造方法、
20 (44) 前記(7)乃至(13)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取することを特徴とする、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌

を誘導する活性を有するペプチド系化合物の製造方法、

(45) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、

(46) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾される認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有することをペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

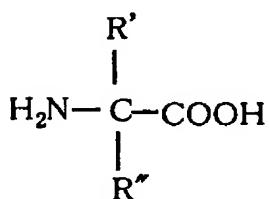
(47) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、および、

(48) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾される認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有することをペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、

にも関する。

本発明において、アミノ酸とはL-アミノ酸、D-アミノ酸、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、天然アミノ酸、合成アミノ酸等あらゆるアミノ酸を含む。

本発明において修飾アミノ酸とは、上記アミノ酸の任意の基が化学修飾されているアミノ酸を意味する。特に、 α -アミノ酸における α 炭素が化学修飾されている修飾アミノ酸が好ましい。すなわち、修飾アミノ酸は、 α -アミノ酸を式（1）



で表したとき、R'、R''はH又は任意の置換基でよくて、要するに天然アミノ酸を化学修飾したものならどのようなものでもよい。なお、R'、R''のいずれか一方はHでもよい。

R'、R''で示される置換基としては、天然のアミノ酸に存在する置換基を、天然のアミノ酸又はそれに対応するD-アミノ酸に存在しない置換分で置き換えたアミノ酸を修飾アミノ酸と称す。

そのような置換分として、例えば天然に存在するアミノ酸が側鎖に-0H、-SH、-NH-又は-NH₂を含む場合、これらをアシル化して形成される基が好適な例として挙げられる。

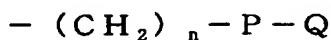
そのためのアシル基としては、例えば有機カルボン酸、有機スルホン酸、有機リン酸化合物から水酸基を除去して形成される基が挙げられる。

有機カルボン酸としてはより具体的には、脂肪酸が挙げられ、その炭素数は好ましくは2～35、より好ましくは6～18、最も好ましくは8～16である。そのような脂肪酸としては、具体的には、オクタン酸（好ましくは、カプリル酸）、デカン酸（好ましくは、カプリン酸）、ド

デカン酸（好ましくは、ラウリル酸）、それらのモノエン又はポリエン脂肪酸等が挙げられる。

有機スルホン酸または有機リン酸化合物についても、その炭素数は 2 ~ 3 5 のものが好ましい。

5 又、さらに修飾アミノ酸は上記の R' 又は / 及び R" で示される基を例えば式



(式中、n は 0 ~ 10 の整数、P は $-\text{C}=\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}=$ 、 $-\text{O}-$ 、

$-\text{C}=\text{S}-$ 、 $-\text{C}=\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{C}=$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、

$-\text{NH}-\text{C}=$ 又は $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-$ 、Q は H 又は C_{1-35} 、

好ましくは C_{1-20} のアルキル)

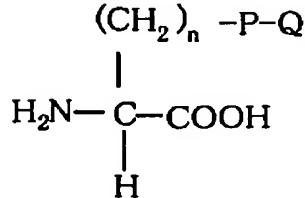
で置き換えたアミノ酸であってもよい。さらに P は $-\text{CO}-$ でもよい。

さらに、P は $-\text{S}-\text{S}-$ 、又は $-\text{NH}-\text{CS}-$ であってもよい。又上 10 記全ての $-\text{NH}-$ において、H が C_{1-35} の飽和又は不飽和アルキル基、 C_{6-20} のアリール基、 C_{7-13} のアラルキル基で置換されていてもよい。

α -アミノ酸を上記式(1)で表した場合に、R' 又は R" を上記の $-(\text{CH}_2)_n - \text{P} - \text{Q}$ で置き換えた修飾アミノ酸は好ましい実施の態様である。

特にアミノ酸がセリンの α 炭素に上記の式の $-(\text{CH}_2)_n - \text{P} - \text{Q}$ で示

15 される置換基が結合した式



(式中、n、PまたはQは上記定義に同じ。)

で示される修飾セリンが好ましい。

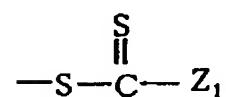
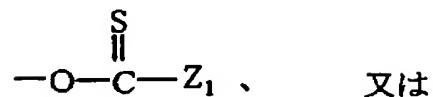
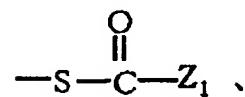
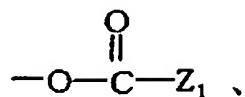
炭素数1以上のアルキル基を介して又は介さずエステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から結合様式についてさらに説明する。

例えば、アミノ酸がセリン、トレオニン、チロシン又はオキシプロリンである場合は、そのアミノ酸は側鎖に水酸基を有する。アミノ酸がシステインである場合は、そのアミノ酸は側鎖にメルカプト基を有する。アミノ酸がリジン、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、プロリ10ン又はオキシプロリンである場合は、側鎖にアミノ基又はイミノ基を有する。

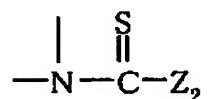
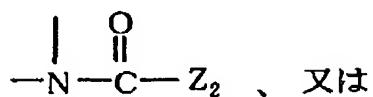
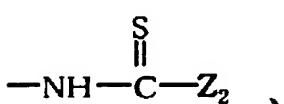
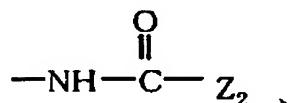
これらの水酸基、メルカプト基、アミノ基、イミノ基は化学修飾されていてもよい。すなわち水酸基又はメルカプト基はエーテル化、エステル化、チオエーテルか又はチオエステル化されていてもよい。イミノ基15はイミノエーテル化、イミノチオエーテル化、アルキル化されていてもよい。アミノ基はアミド化、チオアミド化又はカルバミド化されていてもよい。

また、メルカプト基はジスルフィド化されていてもよく、イミノ基はアミド化、又はチオアミド化されていてもよく、アミノ基はアルキル化20又はチオカルバミド化されていてもよい。

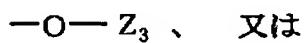
そのように化学修飾された水酸基又はメルカプト基は例えば式



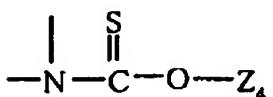
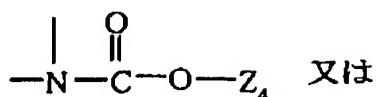
で表わすことができ、アミド化又はチオアミド化されたアミノ基又はイミノ基は



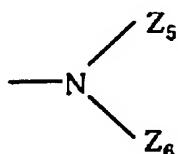
5 で表わすことができ、エーテル化された水酸基又はメルカプト基は式、



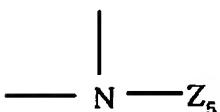
で表わすことができ、イミノエーテル化又はイミノチオエーテル化されたイミノ基としては式



で表わすことができ、アルキル化されたアミノ基として式

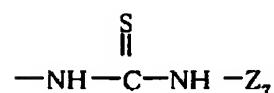
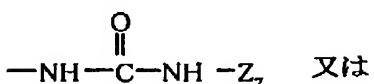


で表すことができ、アルキル化されたイミノ基として式



5

で表わすことができ、カルバミド化又はチオカルバミド化されたイミノ基として式



で表わすことができ、ジスルフィド化されたメルカプト基は、式

10 $-\text{S}-\text{S}-\text{Z}_8$

表わすことができる。

上記式中、 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 及び Z_8 は本発明の精神に反しない限り、どのような化学修飾のための置換基であってもよいが、医薬品分野で常用されるあるいはペプチドのための化学修飾のための置換基が特許文献上又は学術文献上もよく知られているので、本発明においても

そのような自体公知の修飾のための置換基を採用することができ、かつ化学修飾はそのような従来公知の方法に従って行われてよい。

上記式において、 Z_1 は水素原子又は直鎖状、分枝状もしくは環状のアルキル基であってよく、かかるアルキル基は飽和であってもよく、不飽和であってもよい。炭素数は通常は C_{1-50} 、好ましくは C_{6-20} である。

Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 又は Z_8 は水素原子又は直鎖状、分枝状もしくは環状のアルキル基であってよく、かかるアルキル基は飽和又は不飽和であってよい。炭素数は通常 C_{1-10} 、好ましくは C_{1-6} である。

かかる Z_1 、 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 、 Z_5 、 Z_6 、 Z_7 又は Z_8 で表されるアルキル基は、
10 例えば、水酸基、アミノ基、ハロゲン、ニトロ、 C_{1-3} のアルコキシ基等通常ペプチドの化学修飾に使われる置換基で置換されていてよい。

上記において、



の残基である場合は、脂肪酸が結合したアミノ酸の一例である。その場合の脂肪酸としては、例えばカプリル酸、カプリン酸、ララリン酸、酪酸、カプロン酸、ウンデシル酸、パルミチン酸、デカン酸、ノナデカン酸、ベヘン酸、モンタン酸、若しくはラクセン酸などの飽和脂肪酸、
15 例えばアクリル酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、若しくはアアテアロール酸などの不飽和脂肪酸が挙げられる。不飽和脂肪酸はモノエ
テオノンであってもよいし、ポリエンであってもよい。

又さらに、修飾アミノ酸は α -アミノ酸の炭素に α 炭素に結合する、ペプチド結合を構成するカルボキシル基とアミノ基以外の基を水素原子又は飽和又は不飽和アルキル基で置換することにより形成される α -アミノ酸であってもよい。

又さらに、本発明において修飾アミノ酸は、アミノ酸のアミノ基に炭素数 1 乃至 6 の飽和又は不飽和アルキル基で置換することにより形成されるアミノ酸であってもよい。

本発明における非天然アミノ酸としては、アミノ基とカルボキシル基を分子の両端に有するものであって、例えば、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$ 、又は $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOH}$ 等が挙げられる。これらはいずれも、分子鎖長がジペプチド相当長であるが、分子鎖長がペプチド相当長のものも当然含まれる。

また、本発明における非アミノ酸化合物としては、例えば、 $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{R})-\text{COOH}$ 、 $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{R})-\text{CH}_3$ （いずれも、分子鎖長がペプチド相当長）、又は $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CH}_3$ 、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{R})-\text{CH}_3$ （いずれも、分子鎖長がジペプチド相当長）等も含まれる。

ここで、R は、天然アミノ酸の側鎖又は上述した修飾アミノ酸の α 炭素の置換基を表す。

15

図面の簡単な説明

第 1 図は、グレリンのラット胃抽出物からの精製を示す図で、CHO-GHSR62 細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の上昇による蛍光強度の変化は黒棒で示してある。a は、40 g ラット胃より調製した 20 SP-III 画分の Sephadex G-50 (fine) によるゲルfiltration の結果を示す図で、活性画分が分子量約 3,000 ダルトンであることを示している。b は、2 回目の CM-イオン交換 HPLC の結果を示す図で、55~56 分に溶出される活性画分は、逆相 HPLC でさらに精製した。

第 2 図は、グレリンにおける n-オクタノイル修飾を同定したことを示す。a は、天然型グレリン（上段）、及び合成グレリンと合成脱アシル化グレリン（下段）、各々 2 μg を逆相 HPLC で分析した結果を示す図であ

る。b は、天然型グレリン（実線）、合成グレリン（小破線）及び合成脱アシル化グレリン（大破線）による、CHO-GHSR62 細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示す図である。

第 3 図は、グレリンの CHO-GHSR62 細胞に対する特異的な相互作用を示す図で、図中、矢印で示した点で試料を添加した。a は、グレリン、GHRP-6 および GRF (GHRH) による CHO-GHSR62 細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示した図である。b は、GHS-R の特異的阻害剤である [D-Lys-3]-GRP-6 を添加 (○) あるいは非添加 (●) 時の、グレリンによる CHO-GHSR62 細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示した図で、GRF (GHRH) による細胞内カルシウムイオン濃度の変化（黒三角）も示してある。

第 4 図は、ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列、およびこれら前駆体の各種組織での発現を調べた結果を示す図である。a は、ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列を比較した図で、図中、同一アミノ酸は網掛け、点線はシグナルペプチド、黒三角はシグナルペプチドの切断点、三角はカルボキシル末端側の切断点、ボックスは成熟型グレリン部分、* は n-オクタン酸による修飾を示す。b は、ラット各種組織におけるグレリンの発現をノザンプロットによって解析した結果を示す図である。

第 5 図は、in vitro および in vivo におけるグレリンの下垂体ホルモン分泌に及ぼす効果を示す図である。a は、ラット下垂体初期培養細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化による蛍光強度の変化を示した図で、実線はグレリン、破線は脱アシル化グレリンを添加した場合を示す。b は、グレリンによる下垂体ホルモンの分泌を示す図で、図中、黒棒はグレリン添加時、白棒はグレリン非添加時の下垂体ホルモン濃度を示す。c は、雄ラットにグレリンを静脈注射した後の血漿中の下垂体

ホルモン濃度の経時変化を示す図である。図 b および図 c 中で、GH は成長ホルモン、ACTH はアドレノコルティコトロピン、FSH はフォリクル、LH はルテナライジングホルモン、PRL はプロラクチン、TSH はチロイド促進ホルモンを表す。

5 第 6 図は、グレリンを脳室内投与した時の食用増進を示す図で、グレリン投与後 2 時間の摂餌量（平均値±標準誤差）で示してある。a はグレリンの効果についての誤差範囲が 0.0001 未満であることを示している。

10 第 7 図は、ウレタン麻酔ラットでの薬剤投与による胃酸分泌への効果を示す図で、A はラットグレリン (rGhrelin)、B はヒスタミン (Histamine) を投与した場合の結果である。各シンボルは 4 例のラットにおける平均値を表し、標準誤差をエラーバーで示した。対照として生理食塩水 (Saline) を投与した。矢印の時点で薬剤 (Drug) を投与した。

15 第 8 図は、ウレタン麻酔ラットでの胃運動に及ぼすラットグレリンの作用を示す図で、A は生理食塩水 (Saline) およびラットグレリン (rGhrelin) を投与したときの典型的な胃運動波形を示し、B は 4 例のラットにおける平均値を標準誤差値とともに示した図である。矢印の時点で薬剤 (Drug) を投与した。

20 第 9 図は、ラジオイムノアッセイの標準曲線および抗体の交差反応性を示す図で、a は ^{125}I で標識したラットグレリンの N 端側抗体への結合の各種グレリンによる阻害を示す図であり、b は ^{125}I で標識したラットグレリンの C 端側抗体への結合の各種グレリンによる阻害を示す図である。グラフの横軸は、各種グレリンの反応チューブあたりの添加量を示し、縦軸は各種グレリン非存在下でのラットグレリンの結合量 (B_0) に対する各種グレリン存在下での結合量 (B) の百分率 (%) で示した。図中のシンボルは、ラットグレリン (○)、ヒトグレリン (●)、ラット

グレリン-27(□)、[Ser3(decanoyl)]-ラットグレリン(◇)、[Ser3(hexanoyl)]-ラットグレリン(△) および脱脂肪酸ラットグレリン(▼) を示す。

発明を実施するための最良の形態

5 GHS レセプター (GHS-R) の内在性リガンドとなるペプチドについては、GHS-R を発現している細胞に各種臓器又は組織の抽出物を添加し、細胞内カルシウムイオン濃度を測定することにより、当該内在性リガンドの臓器・組織間での分布を知ることができる。

10 GHS-R を発現している細胞としては、恒常的に GHS-R を発現していることが知られている視床下部及び脳下垂体、及びそれらの組織由来の細胞株があるが、GHS-R 遺伝子を適当な細胞、例えば CH0 細胞に導入・発現させた形質転換細胞が望ましい。

15 本願発明の内在性 GHS ペプチドにおいては、該ペプチドが発現している視床下部及び脳下垂体ではなく、消化器系の臓器である胃の抽出物に強い Ca 上昇活性が認められた。従って、目的のオーファン・レセプターの内在性リガンドを見いだすためには、該レセプターが発現している組織・臓器ばかりではなく、他の組織・臓器も広く探索することが必要である。

20 細胞内カルシウムイオン濃度の測定法は公知の方法が利用できるが、望ましくは、カルシウムイオン濃度変化による Fluo-4 AM (Molecular Probe 社)の蛍光強度の変化を利用した FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices 社)がよい。

25 Ca 上昇活性が確認された組織・臓器の抽出物から、目的の内在性 GHS ペプチドを生成するためには、公知の精製方法を用いることができる。

ペプチドの精製法としては、各種分画法による分画後、ゲルfiltration、イオン交換及び逆相クロマトグラフィーを、単独又は組み合わせて用いる

が有効であるが、必ずしも該クロマトグラフィーによる精製にこだわる必要はなく、ペプチドの精製に有効である手段は何でも利用可能である。

また、組織・臓器よりペプチドを単離・精製する際には、組織・臓器に存在するプロテアーゼの作用による目的ペプチドの分解を防止するために、組織・臓器を沸騰水中で熱処理することによりプロテアーゼを失活させることが望ましい。熱処理し組織・臓器を氷冷除去することも、目的ペプチドの抽出・精製に効果がある。

精製された Ca 上昇活性を有するペプチドが、*in vitro* 及び *in vivo* で GH 分泌誘導活性を確認するためには、公知の方法を利用することがで
10 きる。

例えば *in vitro* では、GH を分泌して GHS-R の発現も確認されている脳下垂体細胞に添加して、細胞培養液中に分泌される GH を、抗 GH 抗体を用いたラジオイムノアッセイによって測定することができる。また上記ラジオイムノアッセイ法において、抗 GH 抗体の代わりに他のホルモン
15 に対する抗体を用いれば、該ホルモンの分泌量も測定できる。

in vivo での GH 分泌誘導活性を確認するためには、Ca 上昇活性を有するペプチドを動物の末梢静脈に注射した後の血清中の GH 濃度を測定すればよい。

精製されたペプチドの構造解析には、公知の方法が使用可能である。
20 ペプチドのアミノ酸配列を決定するためには、エドマン分解法によりカルボキシル末端より逐次アミノ酸残基を遊離して、該遊離アミノ酸を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によってアミノ酸を同定する方法、及び該方法を自動化したアミノ酸シーケンサーによる方法がある。

また、GC-MASS によってイオン化したフラグメントの分子量を測定することにより、アミノ酸配列を決定する方法もある。

本願発明の 1 つである修飾アミノ酸を含有するペプチドの場合は、上

記アミノ酸配列を決定する際に修飾アミノ酸が「未知アミノ酸」と同定される。

この場合、当該修飾ペプチドをアミノ酸単位に分解後、修飾アミノ酸を分離・精製して、常用される化合物構造決定法によって修飾アミノ酸を構造決定し、ペプチド全体の構造を知ることができる。また、修飾ペプチドをコードする cDNA から得られる該ペプチドのアミノ酸配列を有するペプチドを化学合成し、当該合成非修飾ペプチドと修飾ペプチドの分子量や物性等から修飾基の構造を推定する方法もある。

構造決定されたペプチド中での、Ca 上昇活性に必要な部分のアミノ酸配列（コア配列）は、該ペプチドをプロテアーゼで切断して生成するペプチド断片の Ca 上昇活性を測定することによって明らかにされる。

用いられるプロテアーゼは、切断するペプチドのアミノ酸配列に特異性の高いプロテアーゼを用いてよいが、特異性が低くても部分分解の条件で反応させることにより該ペプチドから様々なペプチド断片が調製できる。

このようにして調製されたペプチド断片の Ca 上昇活性を測定することにより、Ca 上昇活性に必須のコア配列を知ることができる。

内在性 GH 分泌誘導ペプチドは、アミノ末端から 3 番目のセリンが脂肪酸によりアシル化されているが、内在性 GH 分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列の一部をもったペプチド断片および当該ペプチド断片のセリンの側鎖に脂肪酸がエステル結合した脂肪酸修飾ペプチドは化学的に合成することもできる。

該合成ペプチド断片により内在性 GH 分泌誘導ペプチドについて詳細に解析できる。同時に、種々の脂肪酸で修飾したペプチド断片を比較することにより、Ca 上昇活性に必要な脂肪酸の種類を決めることができる。

例えばアフリカツメガエルなど種によっては、内在性 GH 分泌誘導ペプ

チドは、アミノ末端から3番目アミノ酸残基がセリンではなくトレオニンであり、かかるトレオニンが脂肪酸によりアシル化されているが、かかるペプチド系化合物についても合成することもでき、該化合物を詳細に解析できる。

5 また、脊椎動物におけるGH分泌誘導活性を有するペプチドのアミノ酸配列を比較することにより、脊椎動物で広く保存されている領域を見いだし、該領域のアミノ酸配列からGH分泌誘導活性に必須のコア配列を見いだすことができる。

内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列から推定される塩基配列
10 を持つDNAを化学合成し、該DNAをプローブとして該ペプチドが発現している細胞のmRNAから作製したcDNAライブラリーをスクリーニングして、当該ペプチドをコードするcDNAを取得することができる。

しかし、アミノ酸に対応するコドンは縮重しており、ペプチドのアミノ酸配列から推定される塩基配列が多くなり、このような多種類の塩基配列から合成DNAをプローブとしたスクリーニングが困難になることがある。

そのような場合で、当該ペプチドのアミノ酸配列と一致する配列が、配列データベースにおいて公開された発現DNA断片(EST; Expressed Sequence Tag)の塩基配列から想定されるアミノ酸配列にある場合は、
20 該ESTの塩基配列の一部からなるDNAを合成して、上記cDNAライブラリーのスクリーニングに用いることもできる。

また、cDNAからゲノムDNAを取得することは、常用される方法で行うことができる。

このようにして取得されたcDNAの塩基配列から、内在性GH分泌誘導
25 ペプチドの前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列が明らかにされる。

当該アミノ酸配列を解析することにより、シグナルペプチド、内在性

GH 分泌誘導ペプチド及びその他のペプチド部分、及びこれらのペプチドの切断点が明らかになり、内在性 GH 分泌誘導ペプチドの生成機構が明らかになる。

なお、本願発明の 1 つである内在性 GH 分泌誘導ペプチドの一部のアミノ酸配列、当該ペプチドの前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列及び該ポリペプチドをコードする DNA の塩基配列が、国際出願公開 WO 98/42840において開示されているが、該出願で開示されたペプチドはモチリン (motilin) 様活性を有する 14 アミノ酸からなるペプチドであり、本願発明で開示された Ca 濃度上昇活性や GH 分泌誘導活性については記載がない。

本願発明に係るペプチド系化合物とは、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、次式 (2) で示される構造において、少なくとも 1 つアミノ酸が修飾アミノ酸で置換されているペプチド、又は少なくとも 1 つのアミノ酸が非アミノ酸で置換されたペプチド類縁体、及びそれらのアミノ末端及び/又はカルボキシル末端が修飾されたペプチド誘導体をいう。

本発明において、上記のペプチド、ペプチド類縁体及びペプチド誘導体をペプチド系化合物と総称する。

また、当該ペプチド系化合物において、複数のアミノ酸が修飾アミノ酸及び/又は非アミノ酸で置換されてもよい。本発明においては、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、通常アミノ末端から 1 ~ 10 番目、好ましくはアミノ末端から 1 ~ 4 又は 1 ~ 5 番目のアミノ酸の 1 又は複数が修飾アミノ酸及び/又は非アミノ酸で置換されているのが好適である。中でも、1 ~ 5 番目のアミノ酸が修飾アミノ酸及び/又は非アミノ酸で置換されているのが好適である。

又、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、アミノ末端から 1

～4番目以外の部分で、好ましくは1～6番目以外の部分で、より好ましくは1～10番目以外の部分でのアミノ酸の1又は複数が欠失又は付加されていてもよい。

本発明のペプチド系化合物は好ましくは細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び生体内で成長ホルモンの分泌を誘導するペプチドであって、少なくとも一つのアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換された化合物である。

すなわち、本発明におけるペプチド系化合物は、細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性又は／及び生体内成長ホルモン分泌誘導作用を有し、
10 ペプチド鎖においてアミノ酸が修飾アミノ酸又は／及び非アミノ酸化合物で置換されたペプチド系化合物である。

そのような化合物の具体例として配列番号1、2又は3が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物、配列番号4又は5が示すペプチドにおいて第25番目アミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

また、他の具体例としては、配列番号10、11、16又は17が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

20 さらに他の具体例としては、配列番号22、25、26又は27が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

またさらに他の具体例としては、配列番号29、30又は31が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

また、配列番号28が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Thr

の水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

本発明におけるアシル化によって水酸基に導入されるアシル基は例えば有機カルボン酸、有機スルホン酸、有機リン酸化合物から水酸基を除去して形成される基である。

有機カルボン酸としてはより具体的には、脂肪酸が挙げられ、その炭素数は好ましくは2～35程度、より好ましくは6～18程度、最も好ましくは8～16程度である。そのような脂肪酸としては、具体的には、オクタン酸（好ましくは、カプリル酸）、デカン酸（好ましくは、カプリ10ン酸）、ドデカン酸（好ましくは、ラウリル酸）、それらのモノエン又はポリエン脂肪酸等が挙げられる。

有機スルホン酸、有機リン酸化合物として、その炭素数が2～35程度のものが好ましい。

第3番目のSerの水酸基がアシル化されている配列番号1のアミノ酸配列を含む、いかなるペプチド系化合物又はその薬理学的に許容される塩も本発明における好ましい実施の態様である。

すなわち、本願発明の第2は、配列番号8に記載のアミノ酸配列、望ましくは配列番号1に記載のアミノ酸配列、より望ましくは配列番号9に記載のアミノ酸配列において第3番目のSerの水酸基がアシル化されている脂肪酸修飾ペプチド含む、いかなるペプチド系化合物又はその薬理学的に許容される塩も本発明における好ましい実施の態様である。

また、配列番号8に記載のアミノ酸配列、望ましくは配列番号1に記載のアミノ酸配列、より望ましくは配列番号9に記載のアミノ酸配列のアミノ末端から3番目のアミノ酸残基セリンをトレオニンに変換したアミノ酸配列において第3番目のThrの水酸基がアシル化されている脂肪酸修飾ペプチド含む、いかなるペプチド系化合物又はその薬理学的に許

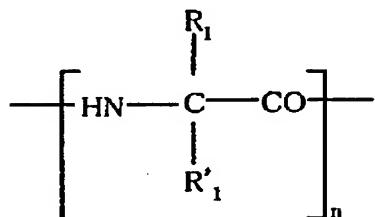
容される塩も本発明における好ましい実施の態様である。

さらに又、本発明の好ましい実施の態様は下記一般式（2）で表される化合物又はその薬理学的に許容される塩である。



5 【式中、X は、アミノ末端アミノ酸のアミノ基の水素原子に相当する部分で、H 又は炭素数が 1 又は複数の飽和又は不飽和アルキル又はアシリル基を表す。Y はカルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基の水酸基に相当する部分で、OH、OZ 又は NR₆R₇ (Z は薬理学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基を表し、R₆ 又は R₇ は H 又は低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基を表し、R₆ と R₇ とは同一又は異なっていてもよい。) を表す。】

ここで、AA1は、式



(式中、 n は1又は2を表し、 R_1 と R_1' は、同一であっても異なっている
15 てもよく、水素又は置換基を表す。)
で表される。

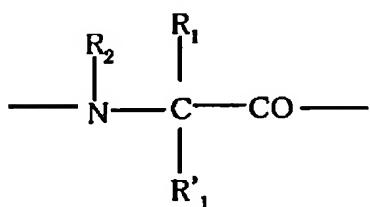
ただし、 n が 2 のときは、その二つの置換基、 R_1 は同一であってもよいし異なっていてもよい。又、 R_1' についても同様である。

置換基の具体例としては、(1)炭素数1以上のアルキル鎖を介し又は
20 介せず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又
はカルバミドからなる群から選択される結合様式で結合する炭素数1以
上の飽和もしくは不飽和アルキル鎖、(2)H又は炭素数1以上の飽和も

しくは不飽和アルキル鎖、又は（3）天然アミノ酸の側鎖等が挙げられる。

また、炭素数1以上のアルキル鎖を介し又は介せず、ジスルフィド又はチオカルバミド結合で結合する炭素数1以上の飽和もしくは不飽和アルキル鎖であってもよい。

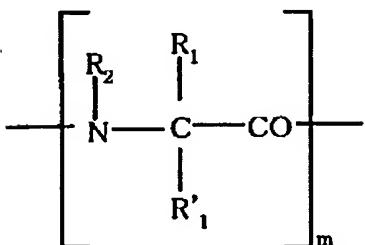
AA2は、式



（式中、 R_1 と R'_1 は前記と同意義。 R_2 は、H又は炭素数1乃至6の飽和或いは不飽和アルキル基を表す。）

10 又は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}_1)-\text{CH}_2-$ 、或いは $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}_1)-\text{CO}-$ （ R_1 は前記と同意義）を表す。

AA3は、式



（式中、mは1以上の整数を表し、 R_1 、 R'_1 又は R_2 は、前記と同意義。）

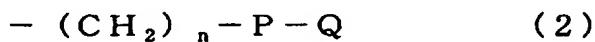
15 ただし、mが2以上の整数のときは、その二つの置換基、 R_1 は同一であってもよいし異なっていてもよい。又 R_1 、 R_2 についても同様である。

Xで示される炭素数が1以上の飽和又は不飽和アルキルとしては具体的にはメチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、t-ブチル、n-ヘプチル、n-ヘキシル、n-デシル、ビ

ニル、プロパニル又はヘキセニル等のC₁₋₂₀のアルキルが好ましい。

Xで示されるアシルとしては、ホルミル、アセチル、プロピオニル、若しくはベンゾイル等のC₁₋₁₀カルボン酸アシル；又はベンゼンスルホニルナフタレンスルホニル等のC₇₋₁₃のスルホン酸アシルが挙げられる。

5 R₁又はR₁'で示される基は例えば式(2)



(式中、nは0～10の整数、Pは $-\text{C}=\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}=$ 、 $-\text{O}-$ 、

$-\text{C}=\text{S}-$ 、 $-\text{C}=\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{C}=$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、

$-\text{NH}-\text{CO}-$ 又は $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-$ を表し、QはH又は上記したXで

示されるC₁₋₂₀のアルキルを表す。)

10 で示される基が好ましい。さらにPは-CO-でもよい。

さらに、Pは-S-S-、又は-NH-CS-であってもよい。また、上記全ての-NH-において、HがC₁₋₃₅の飽和又は不飽和アルキル基、C₆₋₂₀のアリール基で、C₇₋₁₃のアラルキル基で置換されていてよい。

15 より好ましくは、Pは

$-\text{C}=\text{O}-$ 、 $-\text{C}=\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{C}=\text{S}-$ 、

$-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 又は $-\text{NH}-\text{C}=\text{S}-$ である。

また、R₁又はR₁'で示される基は、Pを介さずに $- (\text{CH}_2)_n$ にQが結合している基であってもよい。

Z、R6又はR7で示される低級のアルキル基としては、例えばメチル、

エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、t-ブチル、i-ブチル、n-ペンチル又はn-ヘキシル等のC₁₋₆のアルキルが好ましい。

次に、本願発明に係るペプチド化合物の好ましい態様を以下に示す。

5 (1) AA1 の好ましい態様；(ア) アミノ酸又はペプチド。例えば、Ser、Gly-Ser 又は-NH-(CH₂)₃CH(CH₂OH)CO- (2 アミノ酸残基間のペプチド結合部分が-(CH₂)₂-である場合) 等が挙げられる。(イ) 一級アミン。例えば、-NH-(CH₂)₃CH(CH₂OH)CH₂- (2 アミノ酸残基間のペプチド結合部分が-(CH₂)₂-である場合)、-NH-(CH₂)₃CH(R₁)CH₂- (2 アミノ酸残基間のペプチド結合部分が-(CH₂)₂-である場合) [R₁ は前記と同意義。]、-NH-CH(CH₂OH)CH₂-等が挙げられる。

また、(ア) アミノ酸又はペプチドとして、NH₂-(CH₂)₄-COOH、NH₂-C(CH₃)₂-(CH₂)₃-COOH、又はNH₂-CH(CH₃)-(CH₂)₂-CH(CH₃)-COOH も挙げられる。

15 (2) AA2 の好ましい態様；(ア) アミノ酸。例えば、Ser、homoSer、Cys、homoCys、Asp、Glu、Lys、Ala、Val、Leu、homoLeu、Ile、homoIle、オルニチン、アミノアジピン酸、メチオニン、エチオニン、ブチオニン、又はS-メチルシステイン等が挙げられるが、特に Ser が好ましい。(イ) アミノ酸残基以外の構造；-CH₂-CH(R₁)-CO-、-CH₂-CH(R₁)-CH₂-等が挙げられる (R₁ は前記と同意義。)。

特に、(a) 疎水性側鎖を有するロイシン、バリン、ノルロイシン、ホモロイシン、ホモイソロイシン、ナフチルアラニン類、トリプトファン、フェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン等、あるいは、これらのN-メチルアミノ酸が好ましい。また (b) 側鎖にアシル基、アルキル基、アルケニル基あるいはアラルキル基で修飾が可能な官能基を有する、セリン、ホモセリン、トレオニン、システイン、ホモシステイン、アスパ

ラギン酸、グルタミン酸、アジピン酸、リジン、オルニチンなど、およびこれらの *N*-メチルアミノ酸が好ましい。

これら (b) のアミノ酸側鎖に、エステル、アミド、ジスルフィド、エーテル、チオエーテル、チオエステル、カルバミドまたはチオカルバ
5 ミド結合を介し、アシル基、アルキル基、アルケニル基あるいはアラル
キル基が結合する。また、アミノ酸の α 炭素にアルキル、アラルキル基
が結合してもよい。

(3) AA3 の好ましい態様；アミノ酸又はペプチド。例えば、Phe 又は
配列番号 2 又は 3 記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から 4 番目の
10 Phe から 28 番目の Arg までのアミノ酸配列を有するペプチド若くは当該
配列のカルボキシル末端側のアミノ酸が、配列番号 2 又は 3 記載のアミ
ノ酸配列においてアミノ末端から 5 番目の Leu まで 1 つずつ欠失したペ
プチド。

例えば、

15 Phe Leu、

Phe Leu Ser、

Phe Leu Ser Pro、

Phe Leu Ser Pro Glu、

Phe Leu Ser Pro Glu His、

20 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln、

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg、

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala、

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln、

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln、

25 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg、

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys、

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys,
5 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro
Pro,
10 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro
Pro Ala,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro
15 Pro Ala Lys,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro
Pro Ala Lys Leu,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
20 Pro
Pro Ala Lys Leu Gln,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro
Pro Ala Lys Leu Gln Pro, 又は,
25 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro

Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg、

が AA3 の例として挙げられる。

又さらに、AA3 の例示において、アミノ酸は L-アミノ酸でも D-アミノ酸でもよいことはいうまでもない。又、AA3 の上記例示において、例え

5 ば 1～数個のアミノ酸（好ましくはアミノ酸配列の約 3 分の 1 程度まで）は、非天然アミノ酸又は非アミノ酸単位、例えば

— NH—(CH₂)₃CH(CH₂OH)—

— NH—(CH₂)₃CH(CH₂OH)CO—

— NH—CH(CH₂OH)CH₂—

10 — NH—(CH₂)₃CH(R₁)CH₂—

— CH₂—CH(R₁)—CO—、又は

— CH₂—CH(R₁)—CH₂—

（上記式中 R₁ は前記と同意義）

で置き換えられてもよい。上記式で示される基が AA3 に複数個あり、し

15 かも R₁ で示される基が複数個ある時、それらは同一又は異なる。

又、さらに、AA3 の例示における各アミノ酸のいずれも上記 R₁ で示される置換基を有してよい。AA3 で示される基において、R₁ が複数個存在する時は、それらは同一であっても異なっていてもよい。

以下にペプチドを構成するアミノ酸が側鎖に水酸基、メルカプト基、

20 イミノ基又はアミノ基を有する場合の当該側鎖の好ましい例を示す。なお、以下の R8 は炭素数 1 以上の飽和又は不飽和アルキル鎖を示す。かかるアルキル鎖は X で示される上記のアルキル鎖と同意義でよい。

ア) Ser の側鎖；—CH₂—O—CO—R8 又は—CH₂—O—R8、

イ) homoSer の側鎖；—CH₂—CH₂—O—CO—R8 又は—CH₂—CH₂—O—R8、

ウ) Cys の側鎖；—CH₂—S—CO—R8 又は—CH₂—S—R8、

エ) homoCys の側鎖；—CH₂—CH₂—S—CO—R8 又は—CH₂—CH₂—S—R8、

- オ) Asp の側鎖 ; -CH₂-COO-R8 又は -CH₂-CO-NH-R8、
- カ) Glu の側鎖 ; -CH₂-CH₂-COO-R8 又は -CH₂-CH₂-CO-NH-R8
- キ) Lys の側鎖 ; -(CH₂)₄-NH-CO-R8、
- ク) アミノアジピン酸の側鎖 ; -CH₂-CH₂-CH₂-COO-R8 又は
5 -CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH-R8、
- ケ) オルニチンの側鎖 ; -(CH₂)₃-NH-CO-R8
- コ) 側鎖がアルキル鎖のアミノ酸である Ala、Val、Leu、ホモロイシン、
Ile、ホモイソロイシン、S-メチルシステイン、メチオニン、エチオニン、又はブチオニン等についても同様にアルキル基が上記のように式
10 (2) で示される修飾されたアルキル基であってよい。

又、さらに本発明は、配列番号 2 又は 3 のアミノ酸配列において、アミノ末端から 13、14 又は 15 番目までのアミノ酸からなる部分ペプチドを含有する細胞内カルシウムイオン濃度上昇剤もしくは GH 分泌誘導剤も、好ましい実施の態様として含むものである。この場合の部分ペプチドを構成する各アミノ酸単位は必ずしも化学修飾されている必要はない。
15

さらに又、本発明の好ましい実施の態様は下記のペプチド系化合物である。

なお、グレリン誘導体とは天然型グレリンの化学構造を一部改変したペプチド系化合物のことをいい、短鎖グレリンとは 27 ないし 28 アミノ酸からなる天然型グレリンの一部のアミノ酸が欠失して、27 ないし 28 よりも少ないアミノ酸からなるペプチドのことをいう。また、n 位のアミノ酸残基とはアミノ末端から n 番目のアミノ酸残基のことを示す。
20

グレリン、あるいはその短鎖グレリン誘導体のアミノ末端アミノ酸は、該アミノ酸の α アミノ基が保護されていなければ、いずれのアミノ酸（天然型グレリンではアミノ末端アミノ酸はグリシン）でもよく、また D- 体、L- 体のいずれでもよいが、好ましくは、アラニン、バリン、アミノイソ
25

ブタン酸などが好適である。

2位残基は、いずれのアミノ酸（天然型グレリンではセリン）でもよいが、好ましくは小さな側鎖を有するアラニン、セリン、ヒスチジン、ノルバリンあるいは非アミノ酸化合物等が好適である。

5 1位と2位残基は、アミノ酸2残基に相当する δ -アミノ酸、例えば実施例で示した5-アミノペンタン酸や、5-アミノ-5-ジメチルペンタン酸、2、5-ジアミノペンタン酸等であってもよい。

3位と4位に選ばれるアミノ酸残基は、D-体、L-体いずれでもよく、D-あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよく、これらのいずれの10組み合わせであってもよい。中でも、3位がL-体、または3位、4位ともL-体の組み合わせが好ましい。

3位と4位に選ばれるアミノ酸残基の立体配置は、1位および2位のアミノ酸配列により適宜選択できる。即ち、天然のグレリンの1位と2位のアミノ酸配列、Gly-Serは3位と4位とともにL-体であることが好ましい15が、他のアミノ酸配列、例えば、Aib-His等の場合は3、4位がともにD-体であってもよい。また、1、2位が2残基相当長の δ -アミノ酸、例えばアミノペンタン酸である場合は、3、4位はL-体、D-体のいずれであってもよい。

3位と4位に選ばれるアミノ酸残基は、好ましくは、D-体あるいはL-20体のロイシン、バリン、ノルロイシン、ホモロイシン、ホモイソロイシン、ナフチルアラニン類、トリプトファン、フェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン、およびこれらのD-、あるいはL-N-メチルアミノ酸が好適である。

特に、3位と4位に選ばれるアミノ酸残基は、上記疎水性アミノ酸の中25でも、例えば、ナフチルアラニン類、トリプトファン、フェニルアラニン、シクロヘキシルアラニンなどの芳香族の疎水性アミノ酸がより好ましい。

また、3位と4位に選ばれるアミノ酸残基としては、リジン、アルギニンまたはヒスチジンなどの塩基性アミノ酸も好ましい。なかでもリジンが好ましい。

これら塩基性アミノ酸により、グレリン分子が塩基性となり、Ca上昇活性がより向上する。

3位と4位に選ばれるアミノ酸残基は、側鎖にアシル基(アルカニル基、アルケノニル基もしくはアリールアルカニル基など)、アルキル基、またはアラルキル基で修飾が可能な官能基を有する、セリン、ホモセリン、トレオニン、システイン、ホモシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、10 アジピン酸、リジン、オルニチンなどが好適である。

これらの側鎖に反応性を有するアミノ酸は、D-体またはL-体のいずれでもよく、対応するD-あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよいが、中でも、3位がL-体、または3位、4位ともL-体の組み合わせが好ましい。

15 また、アミノ酸側鎖に、カルバメイト、チオカルバメイト、エステル、アミド、ジスルフィド、エーテル、チオエーテルもしくはチオエステル結合等を介し、アシル基、例えばアラカニル基(炭素数が2～35、好ましくは6～18、より好ましくは8～12)、アルケノニル基(炭素数が2～35、好ましくは6～18、より好ましくは8～12)、アリールアルカニル基(ベンゾイル、フェナセチル、フェニルブチリル、ナフトイル、ナフチルアセチルもしくはナフチルプロピオニル基など)；アルキル基(炭素数が2～35、好ましくは6～18、より好ましくは8～12)；または、アラルキル基(ベンジル、フェネチル、フェニルプロピル、フェニルブチル、フェニルペンチル、ナフチルメチル基等)が結合していてもよい。

20 また、結合を介さずに、3位と4位の α 炭素に上記のアルキル基、アラルキル基が結合してもよい。

25 また、結合を介さずに、3位と4位の α 炭素に上記のアルキル基、アラルキル基が結合してもよい。

3位と4位に選ばれるアミノ酸残基の組み合わせとしては、3位のアミノ酸残基が疎水性の側鎖を有し、4位のアミノ酸剤が疎水性アミノ酸であることが好ましい。

疎水性の側鎖を有する3位のアミノ酸残基としては、アミノ酸の α 炭素に、(a) 炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエーテル、アミドまたはジスルフィド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(b) 炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸が好ましい。特に、アミノ酸の α 炭素に炭素数1以上の飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸がより好ましい。

4位アミノ酸のカルボキシル基が、アミド、メチルアミドもしくはエチルアミド等のアルキルアミド、またはベンジルアミド、アダマンタンアミドもしくはアダマンタンアルキルアミド等のアラルキルアミドであってもよい。

また、アルキルアミド、あるいはアラルキルアミドに、アミノ基またはグアニジド基などの塩基性基を結合してもよい。かかる塩基性基としては、例えば、 $-CONH-CH_2CH_2-NH_2$ 、 $-CONH-CH_2NHCH_3$ 、 $-CONH-CH_2CH_2CH_2-NH-C(NH_2)=NH$ 、 $-CONHCH_2Ph-NH_2$ などが挙げられる。

4位アミノ酸のカルボキシル基に、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を付加してもよく、これら塩基性アミノ酸はD-体、L-体もしくはラセミ体、またはD-もしくはL-N-メチルアミノ酸のいずれであってもよい。

これらのアミノ酸のカルボキシル基は、上述のように、アルキルアミドまたはアラルキルアミドであってよい。さらに、アルキルアミドあるいはアラルキルアミドに、アミノ基、グアニジド基など塩基性基を結合してもよい。かかる塩基性基としては、上述のものなどが挙げられる。

5位以降のアミノ酸配列は、ヒトグレリン、ラットグレリンの5位ロイシンを基点に28位まで、いずれの長さの配列が4位のアミノ酸に付加してもよい。

好ましくはグレリン(1-5)、グレリン(1-6)、グレリン(1-7)、
5 グレリン(1-8)、グレリン(1-9)、グレリン(1-10)、グレリン(1-11)が挙げられる。なお、グレリン(m-n)とは、グレリンのアミノ末端からm番目よりn番目までのアミノ酸配列を有するペプチドを示す。とくに、グレリン(1-5)がより好ましい。

そのカルボキシル末端は、上述のようなアルキルアミド、またはアラ
10 ルキルアミドであるのが好ましい。

また、アルキルアミドまたはアラルキルアミドに、さらにアミノ基またはグアニジド基などの塩基性基を結合させてもよい。かかる塩基性基としては、上述のものなどが挙げられる。

また、5位以降から28位までのいずれかのアミノ酸配列をグレリン
15 (1-4)カルボキシル末端部に付加したカルボキシル末端部欠損グレリン誘導体のカルボキシル末端アミノ酸にアルギニン、リジン、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を付加してもよい。

これら塩基性アミノ酸はD-体、L-体もしくはラセミ体、又はD-もしくはL-N-メチルアミノ酸であってもよい。

20 また、これらの塩基性アミノ酸のカルボキシル基が、上述のようにアルキルアミド、またはアラルキルアミドであってもよい。アルキルアミドまたはアラルキルアミドは、さらにアミノ基またはグアニジド基などの塩基性基を結合してもよい。かかる塩基性基としては、上述のものなどが挙げられる。

25 とくに好ましい態様としては、グレリン(1-5)、グレリン(1-6)、グレリン(1-7)のカルボキシル末端アミノ酸は、D-体、L-体、又

は対応するD-もしくはL-N-メチルアミノ酸である場合が挙げられる。

また、5, 6, 7位の残基にアルギニン、リジン、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を付加してもよく、これらのアミノ酸はD-体、L-体あるいはラセミ体、又はD-、あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよい。

また、これらの塩基性アミノ酸のカルボキシル基が、上述のようなアルキルアミド、またはアラルキルアミドであってもよい。アルキルアミドまたはアラルキルアミドに、さらにアミノ基またはグアニジド基などの塩基性基を結合してもよい。かかる塩基性基としては、例えば、上述のものなどが挙げられる。

本発明に係るペプチド化合物は、上記のように、カルボキシル末端がアルキルアミドまたはアラルキルアミドである場合、該アルキル基またはアラルキル基にさらにアミノ基が結合しているアミド誘導体であってもよく、本発明における好ましい態様の一つである。具体的には、例えば、カルボキシル末端がアミノエチルアミドである場合があげられる。

上記のように、カルボキシル末端がアミド体またはアミド誘導体である本発明に係るペプチド系化合物は、生体内でカルボキシペプチダーゼ類による酵素分解に抵抗することからも有用な化合物である。

同様に、N-メチルアミノ酸を含む本発明に係るペプチド系化合物も酵素抵抗性を有する点で有用な化合物である。

本発明に係るペプチド系化合物は常法により得ることができる。例えば、既に上述のように天然の原料から単離されるか、又は組換えDNA技術及び/または化学的合成によって製造することができる。更にアミノ酸残基に修飾（例えば、アシル化）が必要な場合は自体公知の手段に従って修飾反応を施すことができる。

本発明に係るペプチド系化合物は、より具体的には本願発明に係るペプチドをコードするDNAを有する発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、当該培養物から目的のペプチドを採取することにより本発明に係るペプチド系化合物を得ることもできる。

5 当該宿主細胞を選択することにより、当該細胞内において目的のペプチドにアシル化等の修飾がされた化合物を得ることができる。また、当該ペプチドが修飾されていない場合は、所望により公知の手段に従ってアシル化等の修飾反応を行えばよい。アシル化反応にはリバーゼ等の酵素を用いることもできる。

10 遺伝子を組み込むベクターとしては、例えば大腸菌のベクター(pBR322、pUC18、pUC19等)、枯草菌のベクター(pUB110、pTP5、pC194等)、酵母のベクター(YEp型、YRp型、YIp型)、又は動物細胞のベクター(レトロウィルス、ワクシニアウィルス等)等が挙げられるが、その他のものであっても、宿主細胞内で安定に目的遺伝子を保持できるものであれば、15 いずれをも用いることができる。当該ベクターは、適当な宿主細胞に導入される。目的の遺伝子をプラスミドに組み込む方法や宿主細胞への導入方法としては、例えば、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989)に記載された方法が利用できる。

上記プラスミドにおいて目的のペプチド遺伝子を発現させるために、20 当該遺伝子の上流にはプロモーターを機能するように接続させる。

本願発明において用いられるプロモーターとしては、目的遺伝子の発現に用いる宿主細胞に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、形質転換する宿主細胞がEscherichia属の場合はlacプロモーター、trpプロモーター、lppプロモーター、λPLプロモーター、recAプロモーター等を用いることができ、Bacillus属の場合はSP01プロモーター、SP02プロモーター等を用いることができ、酵母の場

合は GAP プロモーター、 PH05 プロモーター、 ADH プロモーター等を用いることができ、動物細胞の場合は、 SV40 由来プロモーター、レトロウィルス由来プロモーター等を用いることができる。

上記のようにして得られた目的遺伝子を含有するベクターを用いて宿主細胞を形質転換する。宿主細胞としては細菌（例えば、 *Escherichia* 属、 *Bacillus* 属等）、酵母（ *Saccharomyces* 属、 *Pichia* 属、 *Candida* 属等）、動物細胞（CHO 細胞、 COS 細胞等）等を用いることができる。培養時の培地としては液体培地が適当であり、当該培地中には培養する形質転換細胞の生育に必要な炭素源、窒素源等が含まれることが特に好ましい。所望によりビタミン類、成長促進因子、血清などを添加することができる。

脂肪酸修飾ペプチドを直接製造するためには、該ペプチドの前駆体ポリペプチドを適切な位置で切断できるプロセッシング・プロテアーゼ活性を有し、当該ペプチド中のセリン残基をアシル化できる活性を有する細胞が望ましい。このようなプロセッシング・プロテアーゼ活性およびセリンアシル化活性を有する宿主細胞は、当該前駆体ポリペプチドをコードする cDNA を含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞が Ca 上昇活性又は GH 分泌誘導活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを産生することを確認することにより、選抜できる。

培養後、培養物から本発明に係るペプチドを常法により分離精製する。例えば、培養菌体又は細胞から目的物質を抽出するには、培養後、菌体又は細胞を集め、これをタンパク質変性剤（塩酸グアニジンなど）を含む緩衝液に懸濁し、超音波などにより菌体又は細胞を破碎した後、遠心分離を行う。次に上清から目的物質を精製するには、目的物質の分子量、溶解度、荷電（等電点）、親和性等を考慮して、ゲルfiltration、限外filtration、透析、SDS-PAGE、各種クロマトグラフィーなどの分離精製方法を適宜組み合わせて行うことができる。

本発明に係るペプチド化合物は常法により化学合成することができる。例えば、保護基の付いたアミノ酸を液相法及び／又は固相法により縮合、ペプチド鎖を延長させ、酸で全保護基を除去し、得られた粗生成物を上記の精製方法で精製することにより得られる。アシル化酵素又はアシル基転移酵素で選択的に目的位置にあるアミノ酸の側鎖をアシル化することもできる。

ペプチドの製造法は従来既に種々の方法が充分に確立されていて、本発明のペプチド系化合物の製造もそのような自体公知の方法に従って容易に製造できる。例えば古典的なペプチド合成法に従ってもよいし、固相法に従ってもよい。

以下に、組換えDNA技術と化学合成を併用した本発明に係るペプチド化合物の製法について例を挙げて述べる。

アミノ末端部ペプチドの活性エステル、例えば、(1) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-0su、(2) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-0su、又は(3) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Leu-0suを化学合成し、各々、組換えDNA技術により生産したカルボキシル末端部ペプチドである(4) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR、(5) LSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR、又は(6) SPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRとを結合、即ち、(1)と(4)、(2)と(5)及び(3)と(6)を結合させて、28個のアミノ酸からなるペプチド化合物を得る。より具体的には、XXXXZSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRを大腸菌で発現させ、Boc2(0)でアミノ基を保護し、Boc-XXXXZSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPRを得る。次にアミノ酸Zのカルボキシル末端に選択的な酵素で切り出し、(25) NH₂-SPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPRに変換する。この化合物とBoc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Leu-0suを中性から弱アルカ

リ 水 溶 液 中 で 混 合 し 、 得 ら れ る

BocGlySer(Bu)Ser(R10)FLSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)

LQPR をトリフルオロ酢酸処理すれば目的物が得られる。

上記アミノ酸の一文字標記は、1997年12月10日、株式会社ニュートンプレス発行の「細胞の分子生物学第3版」の記載に従った。

また、Boc は *t*-ブチルオキシカルボニルを表し、0su は *N*-ヒドロキシサクシンイミドの水酸基の水素が脱離したものを表し、Bu はブチル基を表し、R10 は上述した本発明に係る修飾アミノ酸の置換基を表す。

本願発明のペプチド系化合物の塩としては薬学的に許容される塩が好ましく、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性又は酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。

無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマール酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジ

ン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

これらの塩の中でもナトリウム塩、カリウム塩が最も好ましい。

5 本願発明のペプチド系化合物又はその薬理学的に許容しうる塩は毒性が低く、GH 分泌誘導作用を有し、そのままもしくは自体公知の薬理学的に許容しうる担体、賦形剤、增量剤などと混合して哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル等）に對して用いることができる。投与量は成人に静脈注射する場合 1 日 0.

10 0.1～5 mg/kg であり、好ましくは 0.04～1.5 mg/kg である。この量を 1 日 1 回～3 回投与するのが望ましい。本願発明のペプチド系化合物は、薬学的に許容される担体と配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの固形製剤；又はシロップ剤、注射剤などの液状製剤として経口又は非経口的に投与することができる。

15 薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。

20 また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。

賦形剤の好適な例としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤の好適な例としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。

25 結合剤の好適な例としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロ

ロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

崩壊剤の好適な例としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスタチナトリウムなどが挙げられる。

5 溶剤の好適な例としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。

溶解補助剤の好適な例としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、

トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナ

10 トリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。

懸濁化剤の好適な例としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオニ酸、レシチン、

塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロ

15 リドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、

ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。

等張化剤の好適な例としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。

20 緩衝剤の好適な例としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。

無痛化剤の好適な例としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。

防腐剤の好適な例としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、

25 クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

抗酸化剤の好適な例としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

上記医薬組成物は、GHの投与による効果と同等以上の効果をもたらし、GHの投与によって起こる様々な副作用も低減できる。

5 当該医薬組成物の適用可能な疾患又はその効果は、GH欠損又は低下が関係するものとして、例えば、小人症、正常人での骨芽細胞及び骨再構成の活性化、GH欠乏症成人での筋肉量及び筋力の増強、GH欠乏症成人での運動能力の向上、小児の重度火傷治癒、排卵誘発におけるゴナンドトロピンとの併用、プレドニゾン投与によるタンパク質代謝異常の予防、
10 重度免疫不全症におけるT細胞「教育」の促進、老人性の体重減少、脂肪組織拡大及び皮膚萎縮を抑制する効果などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

また、GH欠損又は低下と直接関係しない疾患又は効果としては、例えば実施例7に記載したように、当該医薬組成物は拍動量の増加効果があるから、心不全等の心疾患の治療に効果がある。
15

当該医薬組成物の効果はヒトには限らない。すなわち、動物の成長促進、食肉中の脂身の低減等、GH投与と同等以上の効果がある。

また、例えば実施例13に記載したように、本発明に係る医薬組成物は脳室内投与および静脈内投与によって食欲増進作用があることから、
20 食欲不振や拒食症を治療するための食欲増進剤として用いることもできる。

さらに、例えば実施例14に記載したように、本発明に係る医薬組成物は胃運動および胃酸分泌を促進する作用があることから、非潰瘍性消化不良、突発性軽症胃アトニー、機能性消化不良および逆流性食道炎等の胃機能性疾患の治療剤として用いることもできる。
25

加えて、例えば実施例15に記載したように、本発明に係る医薬組成

物は静脈内投与により、骨髓、十二指腸および空腸において細胞増殖促進作用が認められたことから、腸管粘膜保護剤、経静脈栄養時的小腸粘膜障害予防剤及び骨粗鬆症治療剤として用いることができる

また上記医薬組成物は以下ののような疾患の治療又は身体状態の改善に
5 効果がある。

例えば、高齢者における成長ホルモン放出の刺激処置、糖質コルチコイドの異化副作用の予防、オステオポローシスの予防と治療、免疫系の刺激、損傷治癒の促進、骨折修復の促進、成長遅滞の治療、成長遅滞に起因する腎不全もしくは機能不全の治療、成長ホルモン欠損児童を含む
10 生理学的不足状態および慢性疾患に関連した不足状態の治療、肥満および肥満に関連した成長遅滞の治療、プラーダーヴィリ症候群およびターナー症候群に関連した成長遅滞の治療、火傷患者の回復の促進および入院の削減、子宮内発育遅滞、骨格形成異常、高コルチコイド症および
15 クッシング症候群の治療、拍動性成長ホルモン放出の誘導、ストレス患者における成長ホルモンの代用、骨軟骨形成異常、ヌーナン症候群、精神分裂病、うつ病、アルツハイマー病、遅延損傷治癒および心理社会的剥奪の治療、肺機能不全および呼吸器依存症の治療、大手術後のタンパク質異化反応の減衰、癌やエイズ（AIDS）のような慢性疾患によるタンパク損失および悪液質の減少、膵島細胞症を含む高インスリン血症の治療、
20 排卵誘発のためのアジュバント療法、胸腺の発育を刺激するためおよび加齢に伴う胸腺機能の衰退を防ぐため、免疫抑制患者の治療、筋肉強度、運動性の向上、高齢者における皮膚の厚さ、代謝恒常性、腎恒常性の維持、骨芽細胞、骨再造形および軟骨成長の刺激等が挙げられる。

また動物においても以下の効果が期待される。例えば、動物の
25 成長の速度増加、動物の乳生産もしくは獣毛生産増加、ペット動物における免疫系の刺激、ペット動物における高齢疾患の治療、家畜の成長促

進並びにヒツジにおける増毛などが挙げられる。

本願発明による Ca 上昇活性又は GH 分泌誘導活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを抗原とする抗体は、公知の方法により取得できる。当該抗体は、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体のいずれでもよく、
5 それらの取得についても公知の方法が利用できる。また、これらの抗体を用いた脂肪酸修飾ペプチドの測定方法および当該測定法を利用した測定キットの作成も公知の方法が利用できる。

また、実施例 17 に記載したように、グレリンのアミノ末端側及びカルボキシル末端側のペプチドに対する抗体を作成し、前者が 3 位セリン
10 を修飾している脂肪酸を特異的に認識することを利用して、脂肪酸で修飾されたグレリンと脂肪酸が脱離したグレリンを分別定量することに用いることもできる。

該グレリンのアミノ末端側に対する抗体またはカルボキシル末端側のペプチドに対する抗体は、公知の方法により取得でき、モノクローナル
15 抗体あるいはポリクローナル抗体のいずれでもよい。

同様にして、アミノ末端の 3 番目に修飾アミノ酸を有する本発明に係るペプチド系化合物またはその薬理学的に許容される塩において、3 位のアミノ酸残基の側鎖、好ましくは脂肪酸を特異的に認識し、アミノ末端側のペプチドに結合する抗体を作ることもできる。さらに、同様にして、本発明に係るペプチド系化合物またはその薬理学的に許容される塩において修飾アミノ酸を有するペプチドに特異的に結合する抗体を作ることもできる。

上記のように、修飾アミノ酸の側鎖を特異的に認識する抗体と、修飾アミノ酸または／および非アミノ酸化合物以外のアミノ酸またはそれらを含まないペプチドを認識する抗体、好ましくは本発明に係るペプチド系化合物またはその薬理学的に許容される塩のカルボキシル末端側のペ

ペプチドに対する抗体とを組み合わせてなる検査キットも本発明に含まれる。

また、該検査キットを用いて、修飾アミノ酸、好ましくはアシル化されたアミノ酸を有する本発明に係るペプチド系化合物またはその薬理学的に許容される塩と、修飾アミノ酸を有しない本発明に係るペプチド系化合物またはその薬理学的に許容される塩とを分離検出するアッセイ方法も本発明に含まれる。

上記アッセイ方法または検査キットについて、具体的態様を以下に述べる。ただし、本発明は以下の態様に限られない。

すなわち、上記アッセイ方法としては、例えば (i) 本発明のペプチド系化合物等に対する抗体と、被検液中の被検物質と標識化された本発明のペプチド系化合物等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のペプチド系化合物等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明に係るペプチド系化合物等の定量法、および (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された別の本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性または／および不溶化担体上に捕捉されなかった標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法が挙げられる。上記 (i) および (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のアミノ末端側を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等のカルボキシル末端側に反応する抗体であることが好ましい。

また、本発明のペプチド系化合物等のアッセイ方法として、該化合物に対するモノクローナル抗体（以下、抗タンパク質抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質等の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。

これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')、 Fab' 、あるいは Fab 画分を用いてもよい。$

上記抗体を用いる本発明のペプチド系化合物等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）
5 に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサ
10 ンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサ
ンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

本発明にかかるアッセイ方法のうち標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。

放射性同位元素としては、例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 3H または ^{14}C などが
15 用いられる。

上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β －ガラクトシダーゼ、 β －グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。

蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソ
20 チオシアネートなどが用いられる。

発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。

さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビシン系を用いることもできる。

断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に依った。

実施例 1. GHS-R 発現細胞株の作製と Ca 上昇活性の測定

GH 分泌誘導因子 (GHS) が GHS レセプター (GHS-R) に結合することによって生ずる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇 (Ca 上昇活性) をアッセイするために、以下のようにしてラット GHS-R を発現している細胞株を作製した。ラット GHS-R の全長 cDNA は、ラット脳由来の cDNA を鑄型にして、RT-PCR (逆転写酵素-ポリメラーゼチェインリアクション) によって取得した。公知のラット GHS-R の塩基配列 [K. K. McKee, et al, Molecular Endocrinology 11, 415-423 (1997).] から、以下の塩基配列からなるセンスおよびアンチセンスプライマーを合成した。

センスプライマー： 5' -ATGTGGAACGCGACCCCCAGCGA-3'

アンチセンスプライマー： 5' -ACCCCCAATTGTTCCAGACCCAT-3'

増幅された cDNA をベクター pcDNAIII (Invitrogen 社) につなぎ、発現ベクター GHSR-pcDNAIII を作製した。当該発現ベクターで CHO 細胞を形質転換し、GHS-R を安定に発現している形質転換細胞を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の G418 を含有する培地で選択した。選択された細胞株 CHO-GHSR62 は、 $10^{-10}\sim10^{-9}\text{ M}$ の GHRP-6 (Growth Hormone-Releasing hexapeptide) に応答した。細胞内カルシウムイオン濃度の変化 (Ca 上昇活性) は、FLIPR システム (Molecular Device 社) で測定した。測定前に、 4×10^4 の CHO-GHSR62 細胞を壁面が黒い 96 穴マイクロプレート (Corning 社) に植え、12~15 時間培養した。細胞を $4\mu\text{M}$ の蛍光色素 Fluo4 (Molecular Probe 社) と 1 時間保持し、20 mM Hepes ([N-2-hydroxyethyl] -piperazine-*N*-[2-ethanesulfonic acid]) と 2.5 mM プロベネシドを含む Hank's BSS (Hank's Balanced Salt Solution) で 4 回洗浄し、試料を添加して蛍光の変化を測定することによって、Ca 上昇活性をアッセイした。

実施例 2. 内在性 GH 分泌誘導ペプチドの精製

実施例 1 に記載した CHO-GHSR62 細胞用いて、ラット由来の各種組織・臓器について、Ca 上昇活性を調査した結果、ラット胃由来のペプチド抽出物が 0.5 mg 相当でも強い Ca 上昇活性を有することがわかった。

そこで、数種類のクロマトグラフィーを用いて、ラット胃抽出物から以下の方法で Ca 上昇活性を有するペプチドを精製した。

新鮮なラットの胃 40 g を、混在するプロテアーゼを失活するために、5 倍量の沸騰水中で 5 分間煮沸した。冷却後、煮沸した試料を 1M AcOH-20 mM HCl に調整し、ポリトロン・ミキサーを用いてペプチドを抽出した。抽出液を 11,000 rpm、30 分間遠心し、上清をエバポレーターで約 40 ml に濃縮した。濃縮液にアセトンを 66% になるように添加して、アセトン沈殿を行い、生じた沈殿を除去した後、上清のアセトンを蒸発させた。上清を、0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) で平衡化した 10 g の Sep-Pak C18 カートリッジ (Waters 社製) に加え、10% CH₃CN/0.1% TFA で洗浄後、60% CH₃CN/0.1% TFA で溶出した。溶出液の溶媒を蒸発後、凍結乾燥を行った。試料を 1M AcOH に溶解して、1M AcOH で平衡化した SP-Sephadex C-25 (H⁺型) に吸着させた。1M AcOH、2M ピリジンおよび 2M ピリジン-AcOH (pH 5.0) で段階的に溶出することによって、SP-I、SP-II および SP-III の 3 つの画分を、それぞれ得た。SP-III 画分を Sephadex G-50 ゲルfiltration カラムに掛け、各々の画分の一部について CHO-GHSR62 細胞を用いた Ca 上昇活性のアッセイを行った。Sephadex G-50 カラムクロマトグラフィーの結果を第 1a 図に示したが、分子量約 3,000 に相当する活性画分 (第 1a 図中、フラクション 43-48) を、TSK CM-2SW カラム (4.6 x 250 mm, Tosoh 社製) を用い pH 6.4 で、CM-イオン交換による HPLC (高速液体クロマトグラフィー) で分画した。CM-HPLC での活性画分を、同一カラムを用い、pH 4.8 で二次 CM-HPLC で分画した (第 1b 図)。活性画分 (第 1b 図中、

溶出時間 55-56 分) を、 μ Bondasphere C-18 カラム (3.9 x 150 mm、Waters 社製) を用いた逆相 HPLC で单一にまで精製した。40 g のラットから 16 μ g の Ca 上昇活性を有するペプチドを精製し、グレリン (ghrelin) と命名した。

5

実施例 3. グレリンの構造解析

精製したラット由来のグレリンのアミノ酸配列をペプチド・シーケンサー (ABI 494、Applied Biosystems 社) で決定した。グレリンは、Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser 10 Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg (Xaa は未同定アミノ酸) の配列からなる 28 アミノ酸残基で構成されるペプチドであった。Xaa はラット cDNA の塩基配列から Ser であり、当該ペプチドにおいては Ser が何らかの修飾を受けていることがわかった。

そこで、アミノ末端から 3 番目のセリンが修飾されていない非修飾グレリンをペプチド合成機 (ABI 433A、Applied Biosystems 社) で化学合成した。非修飾合成グレリンの逆相 HPLC での溶出時間は、天然型グレリンと大きく異なっていた (第 2a 図) ので、非修飾合成グレリンは天然型グレリンよりも著しく親水性であることがわかった。

以上の結果から、天然型グレリンのアミノ末端から 3 番目のセリン (セリン 3) は疎水性の残基で修飾されていることがわかった。

セリン 3 の修飾基を明らかにするために、精製したグレリンを電子スプレーイオン化マス分析機 (ESI-MS) 分析した。観測された天然型グレリンの分子量 (3314.9 ± 0.7) は、cDNA の塩基配列から得られた非修飾グレリンペプチドの分子量 (3188.5) よりも 126 大きかった。以上の結果から、天然型グレリンはセリン 3 の水酸基が n-オクタノイル (C8:0) 脂肪酸で修飾されているとわかった。

このことを確認するために、n-オクタノイル (C8:0) グレリンペプチドを化学合成して、逆相 HPLC での溶出時間を調べた。n-オクタノイル (C8:0) ペプチドの化学合成は、セリン 3 の水酸基以外の全ての官能基を保護したペプチドをペプチド合成機 (ABI 433A、Applied Biosystems 社) を用いて Fmoc 固相法で合成し、セリン 3 の水酸基を 4-(ジメチルアミノ)ピリジンの存在下で、n-オクタン酸とエチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドでアシル化して合成した。合成した n-オクタノイルペプチドは精製した天然型グレリンと同一の溶出時間であった (第 2a 図)。さらに、合成 n-オクタノイルペプチドおよび天然型グレリンをキモトリプシン処理によって得られる、アミノ末端から 4 番目までのペプチド断片 (Gly 1 – Phe 4) は、逆相 HPLC で同一の溶出時間を示した。

以上の結果から、ラット由来の天然型グレリンは配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有し、セリン 3 の水酸基が n-オクタン酸 (カプリル酸) でアシル化された構造 (第 2c 図) であると結論された。

また、ヒトグレリンをヒト胃抽出物から精製し、その構造が配列番号 3 に記載したアミノ酸配列を有し、アミノ末端から 3 番目のセリン側鎖の水酸基が n-オクタン酸 (カプリル酸) でアシル化された構造であることがわかった (第 4a 図)。

なお、上記ラット及びヒト由来のグレリンの構造は、第 1b 図中の活性画分のうち最初のピーク画分 (溶出時間 55-56 分) 精製したものの構造であるが、第 1b 図の他の活性画分についても精製後、上記と同様の方法で構造解析を行った結果、セリン 3 を修飾している脂肪酸はカプリル酸 (C8:0) 以外に、カプリル酸のモノエン酸 (C8:1)、カプリン酸 (C10:0) およびそのモノエン酸 (C10:1)、およびラウリル酸 (C12:0) およびそのモノエン酸 (C12:1) があることがわかった。

また、ニワトリ、ウナギ及びカエルのグレリンを実施例 2 と同様にして胃抽出物から精製し、さらに実施例 3 と同様にして構造解析した。その構造は、ニワトリのグレリンは配列番号 25 に記載したアミノ酸配列、ウナギのグレリンは配列番号 26 に記載したアミノ酸配列、カエルのグレリンは配列番号 27 に記載したアミノ酸配列を有し、いずれもアミノ末端から 3 番目のセリン側鎖の水酸基が n-オクタン酸（カプリル酸）でアシル化された構造であることがわかった。

さらに、アフリカツメガエル、ニジマス及びイヌのグレリンを実施例 2 と同様にして胃抽出物から精製し、さらに実施例 3 と同様にして構造解析した。

その構造は、アフリカツメガエルのグレリンは配列番号 28 に記載したアミノ酸配列、ニジマスのグレリンは配列番号 29 および 30 に記載したアミノ酸配列、イヌのグレリンは配列番号 31 に記載したアミノ酸配列を有し、いずれもアミノ末端から 3 番目のセリン側鎖またはトレオニン側鎖の水酸基が n-オクタン酸（カプリル酸）でアシル化された構造であることがわかった。

なお、ニジマスからは、配列番号 29 に記載した 23 アミノ酸残基からなるグレリン-23 と、配列番号 30 に記載した 20 アミノ酸残基からなるグレリン-23 とが得られた。

20

実施例 4. グレリンの Ca 上昇活性

天然型グレリンおよび n-オクタノイル修飾合成グレリンは Ca 上昇活性を有していたが、非修飾合成グレリンは Ca 上昇活性を顕著には示さなかった（第 2b 図）。また、n-オクタン酸又は n-オクタン酸と非修飾合成グレリンの混合物は Ca 上昇活性を顕著には示さなかったことから、天然型グレリンの n-オクタン酸基は Ca 上昇活性に重要な構造であること

がわかった。以後、グレリンとは[0-n-オクタノイル-セリン 3]-グレリン（第 2c 図）のことを示す。

グレリンは、CHO-GHSR62 細胞において、GHRP-6 よりも高い細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性（Ca 上昇活性）を示したが、GHRH 5 (GH 放出ホルモン、第 3a 図では GRF) は Ca 上昇活性を示さなかった（第 3b 図）。グレリンの Ca 上昇活性は 10^{-11} M から認められ、EC₅₀ は 2.5 nM であった。GHS-R の特異的アンタゴニストである [D-Lys 3]-GHRP-6 [R. G. Smith, et al., Science 260, 1640-1643 (1993)] 10^{-4} M の存在下で、グレリンによる Ca 上昇活性は抑制され、高濃度のグレリンで、アンタゴ 10 ニスト非存在下での Ca 上昇活性に回復する（第 3b 図）。以上の結果は、グレリンの Ca 上昇活性が GHS-R の特異的アンタゴニストによって拮抗的に阻害されることを示している。

実施例 5. グレリン前駆体 cDNA とその各種臓器での発現

15 グレリンのアミノ酸配列は公知のいかなるペプチドのアミノ酸配列とも相同意を示さなかつたが、GenBank データベースをホモロジー検索したところ、ラット EST (Expressed Sequence Tag) 配列の 1 つ (GenBank 受理番号 AI549172) に同一の配列が認められた。この EST 配列を基に以下の PCR プライマーを合成した。

20 センスプライマー : 5' -TTGAGCCCAGAGCACCAGAAA-3'

アンチセンスプライマー : 5' -AGTTGCAGAGGAGGCAGAAGCT-3'

ラット胃由来の cDNA を鑄型に上記の 2 つプライマーを用いて RT-PCR を行った。PCR の条件は、1 サイクルが 98 °C で 10 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 1 分間を、35 サイクル行った。增幅された DNA 断片をプロ 25 ーブとして、ラット胃 cDNA ライブライアリをスクリーニングした。約 2 x 10^5 の組換えファージをスクリーニングして、ラット由来グレリンをコ一

ドする全長 cDNA を取得した。

ラットグレリン cDNA は、配列番号 6 に記載した 501 塩基からなり、117 アミノ酸（第 4a 図）からなるグレリン前駆体（prepro-ghrelin）をコードしていた。グレリン前駆体のアミノ末端の 23 アミノ酸残基はシグナル 5 ペプチドの性質を備えていた。グレリンはグリシン 24 から始まり、成熟型グレリンの最後の 2 つのアミノ酸（Pro-Arg）は、プロテアーゼによる切断を受ける配列であった。

ラットグレリン cDNA を用いて、低ストリンジェント条件でヒト胃 cDNA ライブラリーをスクリーニングして、全長ヒトグレリン cDNA を取得した。10 ヒト胃 cDNA ライブラリーは、ヒト胃 poly(A)⁺RNA (Clontech 社) から、cDNA 合成キット (Pharmacia 社) を用いて作製した。取得した全長ヒトグレリン cDNA は、配列番号 7 に記載した 511 塩基からなり、117 アミノ酸（第 4a 図）からなるヒトグレリン前駆体（prepro-ghrelin）をコードしていた。ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列は、15 82.9% の同一性を示し、グレリンは生物種間で高度に保存されていることが判明した。

グレリンの組織間分布を知るために、ラットの種々の組織から単離された poly(A)⁺RNA を解析した（第 4b 図）。ラット組織のノザーンプロット解析によって、0.62 kb のグレリン前駆体 mRNA が胃に認められた。心 20 室（Ventricle）にも 2 本のかすかなバンドが認められたが、これらは 6.2 kb および 1.2 kb の mRNA で、胃での mRNA よりも大きく、胃とは異なった mRNA のスプライシングが推定された。以上の結果からグレリンの主な発現部位は胃であることがわかった。

25 実施例 6. グレリンの下垂体ホルモン分泌への効果

グレリンが GH 分泌誘導活性を有しているかを *in vitro* および *in vivo*

で調べた。まず *in vitro* でのアッセイとして、下垂体前葉の初期培養細胞へのグレリンの効果を調べた。4 週令の雄 SD ラットから下垂体前葉を採取し、コラゲナーゼ処理で分散させた後、細胞を集め、10%FCS (ウシ胎児血清) と抗生物質を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) 培地で 2 回洗浄し、DMEM 培地に懸濁して、下垂体前葉初期培養細胞を調製した。5 × 10⁴ の細胞を、ポリ-D-リジンでコートした 96 穴の細胞培養プレートに植え、3~4 日培養した。培養液を 0.1 ml の試料を含有する DMEM 培地と交換し、37 °C で 15 分間保持した。培養液の一部を採取して、ラジオイムノアッセイによって、培養液中の各種下垂体ホルモンの濃度を測定した。下垂体ホルモンのうち、GH、FSH、LH、PRL、TSH は Biotrak/Amersham 社製のキットを用い、ACTH は Peninsula Laboratories 社製の高感度 EIA キットを用いた。

グレリンを下垂体前葉初期培養細胞に添加すると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が認められ、非修飾合成グレリンでも弱いながらも Ca 上昇活性が認められた (第 5a 図)。この結果は、グレリン及び非修飾合成グレリンが下垂体細胞に直接作用することを示している。次に、下垂体前葉初期培養細胞を用いてグレリンが GH 分泌誘導活性を調べたところ、10⁻⁶ M のグレリンの添加により、培養液中の GH 濃度だけが濃度依存的に増加し、他の下垂体ホルモン (FSH、LH、PRL、TSH) の濃度増加は認められなかった (第 5b 図)。

グレリンの GH 分泌誘導活性を *in vivo* で調べた。合成グレリン 10 μg を雄ラット (250 g) の静脈に注射後、60 分まで経時的に血液を採取して、血漿中の下垂体ホルモンの濃度を上記ラジオイムノアッセイによって測定した。下垂体ホルモンの内、GH だけが血液中に放出され、グレリンの静脈注射後 5~10 分で最高値に達した。この結果から、胃から血液中に放出されたグレリンが下垂体前葉細胞に作用し、血液中に GH を放出

することがわかり、グレリンが未同定だった特異的な内在性 GH 分泌誘導物質であることが確認された。

実施例 7. ラットでの心拍出量増加

5 麻酔下ラットを用いて心血管系に及ぼすグレリン急性投与の効果を調べた。体重 220-250g の Wistar 系雄性ラット（ケアリー）を用い、心血管系に及ぼすグレリン急性投与の効果を検討するためラットを無作為に 4 群 (10, 1, 0.5, 0.2 μ g 投与群) に分けた。グレリンは生理食塩水で希釈し、ラット 1 匹あたりの投与量を、10, 1, 0.5, 0.2 μ g に調整
10 して、心拍出量測定のため右総頸静脈に挿入したインジェクションチューブ (PE50) から 120 μ l 急性投与した。

動力学的指標として全身血圧、心拍出量を測定し、さらに末梢血管抵抗値を算出した。ラットをペントバルビタールで麻酔後、背位に固定した。平均血圧測定のために、右大腿動脈にヘパリンで満たしたポリエチレンカ
15 ニューレ (PE50) を挿入した。心拍出量の測定は熱希釈式心拍出量計 (CARDIOTHER M500R) を用いて測定した。右総頸静脈に生理食塩水で満たしたインジェクションチューブ (PE50) を挿入し、右心室内で留置した。右総頸動脈からマイクロカテーテルを挿入し、大動脈起始部に留置した。注入液は室温 (25°C) の生理食塩水 100 μ l を用いた。熱希釈式心拍出量
20 計のMEASUREスイッチを押すと同時に注入液 (生理食塩水 100 μ l) を注入し、心拍出量を測定した。測定は 5 回行いその平均値を心拍出量とした。平均血圧および心拍出量は、グレリン投与前、投与後 1, 5, 15, 30 分の値を測定した。末梢血管抵抗は平均血圧を心拍出量で除して算出した。

第 1 表

体重 (g)	グレリン1 μ g投与後の心拍出量 (ml/min/kg)				
	0分	1分	5分	15分	30分
平均	230	347	382	367	341
SEM	3.7	14.3	10.2	11.5	7.9
					8.8

表中、SEMは平均値の標準誤差 (Standard Error Heans) を表す。

第2表

体重 (g)	グレリン10 μ g投与後の心拍出量 (ml/min/kg)				
	0分	1分	5分	15分	30分
平均	237	350	390	392	370
SEM	1.0	8.5	7.4	15.8	14.7
					13.8

5 表中、SEMは平均値の標準誤差 (Standard Error Heans) を表す。

グレリン1 μ g投与群 (第1表) 及びグレリン10 μ g投与群 (第2表) において、投与後1分及び5分で、心拍出量の増加が認められた

実施例8. 各種起源からのグレリンおよびグレリン-27の単離

10 ラット胃抽出物から実施例2に記載した方法でCa上昇活性を指標にグレリンを精製した。二次CM-HPLCでの活性画分 (第1b図中、溶出時間59分)を、 μ Bondasphere C-18カラム (3.9 x 150 mm、Waters社製)を用いた逆相HPLCで单一にまで精製した。この画分を電子スプレーイオノ化マス分析機 (ESI-MS) 分析した結果、分子量 (3187.2 ± 0.9) のピークが観測されたが、この値は28アミノ酸からなりオクタノ酸 (C8) 修飾された天然型グレリンよりも約126小さかった。このペプチドのアミノ酸配列をペプチド・シーケンサー (ABI 494、Applied Biosystems社)で決定したところ、Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala

15

Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg (Xaa
は未同定アミノ酸)の配列からなる 27 アミノ酸残基で構成されるペプチ
ドであった。すなわち、28 アミノ酸で構成されるグレリンのアミノ末端
から 13 番目又は 14 番目のグルタミンが 1 つ欠失したアミノ酸配列から
5 なっていた。このペプチドの Ca 上昇活性は、実施例 9 に示すように 28
アミノ酸のグレリンと同様であることから、グレリン-27 と命名した。
ヒトの胃抽出物からも、ラットの場合と同様にヒト・グレリン-27 を単
離し、配列番号 1 1 記載のアミノ酸配列からなることを確認した。なお、
上記二次 CM-HPLC で 64-65 分にあるピーク画分を精製し、電子スプレー
10 イオン化マス分析機 (ESI-MS) 分析した結果、分子量 (3341.4±0.9) の
ピークが観測された。この脂肪酸修飾ペプチドは 28 アミノ酸からなるこ
とから、グレリン (28 アミノ酸) のアミノ末端から 3 番目のセリンがデ
カン酸 (C10) で修飾されたものであることがわかった。

グレリン 27 前駆体をコードする cDNA を、実施例 5 で作成したラット
15 胃 cDNA ライブライマーから、実施例 5 で作成した PCR 増幅 DNA 断片をプロ
ーブとした、ブラークハイブリダイゼーションでクローニングした。cDNA
の塩基配列を決定し、グレリン-27 前駆体をコードすることを確認した。
得られたグレリン-27 前駆体 cDNA は、配列番号 1 4 記載の塩基配列から
なり、配列番号 1 2 記載のアミノ酸配列を有する 116 アミノ酸からなる
20 グレリン-27 前駆体をコードしていた。また、上記と全く同様の方法でヒ
ト・グレリン-27 前駆体 cDNA をクローニングし、配列番号 1 5 記載の塩
基配列からなり、配列番号 1 3 記載のアミノ酸配列を有する 116 アミノ
酸からなるヒト・グレリン-27 前駆体をコードしていることがわかった。

ブタ由来のグレリンおよびグレリン-27 の前駆体をコードする cDNA を、
25 ブタ cDNA ライブライマーから実施例 5 に記載の方法によって、実施例 5 に
記載の PCR 増幅 DNA 断片をプローブとしたブラークハイブリダイゼーシ

ヨンでクローニングした。得られた cDNA クローンの塩基配列を決定し、
5 ブタ・グレリン前駆体又はブタ・グレリン-27 前駆体をコードしているこ
とを確認した。得られたブタ・グレリン前駆体 cDNA は、配列番号 20 記
載の塩基配列からなり、配列番号 18 記載のアミノ酸配列を有する 118
アミノ酸からなるグレリン前駆体をコードしていた。また、ブタ・グレ
10 リン-27 前駆体 cDNA は、配列番号 21 記載の塩基配列からなり、配列番
号 19 記載のアミノ酸配列を有する 117 アミノ酸からなるグレリン-27 前
駆体をコードしていた。従って、ブタ・グレリン（28 アミノ酸）及びブ
タ・グレリン-27（27 アミノ酸）は、各々、配列番号 16 および 17 記
載のアミノ酸配列からなっている。

ウナギ、アフリカツメガエルまたはニジマス由来のグレリンの前駆体
をコードする cDNA を、各種の cDNA ライブラリーから実施例 5 に記載の
方法によって、実施例 5 に記載の PCR 増幅 DNA 断片をプローブとしたプ
ラーカハイブリダイゼーションでクローニングした。得られた cDNA クロ
15 ーンの塩基配列を決定し、グレリン前駆体をコードしていることを確認
した。

得られたウナギ・グレリン前駆体 cDNA は、配列番号 36 記載の塩基配
列からなり、アフリカツメガエル・グレリン前駆体 cDNA は、配列番号 3
7 記載の塩基配列からなり、ニジマス・グレリン前駆体 cDNA は、配列番
20 号 38 または 39 記載の塩基配列からなっていた。

なお、ニジマスからは、配列番号 38 に記載したグレリン-23 前駆
体をコードする cDNA と、配列番号 39 に記載したグレリン-20 前駆体
をコードする cDNA とが得られた。

上記 cDNA の塩基配列から、ウナギ・グレリン前駆体は、配列番号 32
25 記載のアミノ酸配列を有し、アフリカツメガエル・グレリン前駆体は配
列番号 33 記載のアミノ酸配列を有し、ニジマス・グレリン前駆体は配

列番号 3 4 または 3 5 記載のアミノ酸配列を有することがわかった。

なお、ニジマスからは、配列番号 3 4 に記載したグレリン-23 前駆体のアミノ酸配列と、配列番号 3 5 に記載したグレリン-20 前駆体のアミノ酸配列とがわかった。

5 ウシ・グレリン前駆体 cDNA は PCR 法によってクローニングした。すなわち、ラット、ヒトおよびブタ由来のグレリン及びグレリン-27 で保存されているアミノ酸配列を基に設計した塩基配列を有する合成 DNA をプライマーとして、ウシ胃 cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を行った。増幅された DNA 断片は配列番号 2 4 記載の塩基配列を有しており、配列番号 2 3 記載のウシ・グレリン-27 前駆体の一部をコードしていた。従ってウシ・グレリン-27 は配列番号 2 2 記載のアミノ酸配列を有している。また、ウシ胃 cDNA ライブラリーを鋳型とする上記 PCR で増幅された DNA 断片中には、グレリン(28 アミノ酸)前駆体をコードする DNA はなかった。

10 ラット、ヒトおよびブタ由来のグレリン、及びラット、ヒト、ブタおよびウシ由来のグレリン-27 のアミノ酸は、非常によく似ており、特にアミノ末端から 10 番目までのアミノ酸配列は、上記 7 種のグレリンで完全に一致していた。

実施例 9. 各種グレリン誘導体の活性比較

20 ラットおよびヒト由来のグレリンを各種プロテアーゼによる部分分解したペプチド断片、又は化学合成したペプチドの Ca 上昇活性を比較することにより、Ca 上昇活性に必要なコア・アミノ酸配列および修飾脂肪酸の鎖長の最適値を求めた。Ca 上昇活性は最大値の 50 % の活性を示すグレリンの濃度 (EC50, nM) で表した。従って、EC50 の値が低い程、活性が高いことになる。

第 3 表

各種グレリン誘導体の活性比較

起源	配列番号	アミノ酸	脂肪酸修飾	Ca 上昇活性 (EC50, nM)	備考
ヒト	3	1-28	Acyl (C : 8)	2.6	天然型グレリン
ヒト	3	1-15	Acyl (C : 8)	7.0	
ヒト	3	1-11	Acyl (C : 8)	15	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 8)	2.9	天然型グレリン
ラット	2	1-15	Acyl (C : 8)	8.6	
ラット	2	1-11	Acyl (C : 8)	15	
ラット	2	1-10	Acyl (C : 8)	19	
ラット	2	1-9	Acyl (C : 8)	38	
ラット	2	1-8	Acyl (C : 8)	100	
ラット	2	1-4	Acyl (C : 8)	480	
ラット	2	16-28	Acyl (C : 8)	>10000	
ラット	2	(1-12)+ (14-28)	Acyl (C : 8)	2.8	グレリン-27
ラット	2	1-28	Acyl (C : 16)	3.1	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 10)	2.6	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 6)	16	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 4)	280	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 2)	780	

グレリンの Ca 上昇活性は、アミノ末端側に存在する。アミノ末端から 4 番目のアミノ酸までのペプチドで十分な Ca 上昇活性はあるが、アミノ末端から 10 番目のアミノ酸までのペプチドであれば、天然型グレリンに近い、強い Ca 上昇活性がある。また修飾脂肪酸の鎖長について、C : 2 (アセチル基) であっても十分活性はあるが、C : 8 (オクタノイル基) で Ca 上昇活性が最高になり、その後脂肪酸の炭素数が C : 10 (デカノイル基)、C : 16 と増加しても強い Ca 上昇活性は変化しない。すなわち、アミノ末端から 3 番目のセリンを修飾している脂肪酸は、炭素数 8 以上であれば Ca 上昇活性が最も強くなる。

実施例 10. 各種グレリン誘導体化合物の合成

(1) ペプチド誘導体合成

$\text{Fmoc-DSer(C}_8\text{H}_{17}\text{)}$ および $\text{Fmoc-Ser(C}_8\text{H}_{17}\text{)}$ 以外のアミノ酸誘導体と合成試薬をパーキンエルマー社、ノバビオケム社あるいは渡辺化学株式会社より購入した。ペプチド鎖の延長は主にパーキンエルマー社製アプライドバイオシステム 433A 合成機を使用し、Boc 法、あるいは Fmoc 法にて保護ペプチド誘導体-樹脂を構築した。Boc 法にて得られた保護ペプチド樹脂は、p-クレゾール存在下、無水弗化水素 (HF) で脱保護してペプチドを遊離させ、精製に供した。Fmoc 法で得られた保護ペプチド樹脂はトリフルオロ酢酸 (TFA)、あるいは種々のスカベンジャーを含む希釈 TFA で脱保護し、遊離したペプチドを精製に供した。精製は、C4 あるいは C18 を用いた逆相 HPLC にて実施した。精製品は、逆相 HPLC にてその純度を確認し、アミノ酸組成分析および質量分析にて構造を確認した。

本発明品のペプチドは通常のペプチド合成法によって製造される。例えば、「生化学実験講座 1 タンパク質の化学」第 4 卷の第 2 章、第 3 章(東京化学同人)、あるいは「統医薬品の開発 1 4 ペプチド合成」(廣川書店)等の成書に記載されている方法によって製造が可能である。従って、本発明品のペプチドの代表的な合成例を以下に示した。具体的には、アシル化ペプチドの合成例とアルキル化ペプチドの合成例を示した。また、ヒト由来のグレリン(以下、hGhrelin と略すこともある)あるいはラット由来のグレリン(以下、rGhrelin と略すこともある)をトリプシン、あるいはキモトリプシン、あるいは両酵素を順番に作用させて、以下のグレリン断片 (19. Ghrelin(16-28)、20. hGhrelin(1-15)、21. rGhrelin(1-15)、23. hGhrelin(1-11)、24. rGhrelin(1-11)、25. Ghrelin(1-10)、26. Ghrelin(1-9)、27. Ghrelin(1-8)、30. Ghrelin(1-4))

を調製し、分析用 HPLC で単離したものを活性測定に供した。41. [N-Acetyl]-Ghrelin(1-10)は、常法に従い Ghrelin(1-10)を N-アセチルサクシンイミド処理して調製した。化合物番号 2. rat Ghrelin は天然物を使用、10. [Ser³(Butyryl)]-rGhrelin、11. [Ser³(Hexanoyl)]-rGhrelin、5 12. [Ser³(Decanoyl)]-rGhrelin、13. [Ser³(Lauroyl)]-rGhrelin、14. [Ser³(Palmitoyl)]-rGhrelin は、化合物 1 hGhrelin の合成に用いたのと同様の方法で合成し、活性測定に供した。

〔主な略号〕

HMP 樹脂；4-hydroxymethyl-phenoxyethyl 樹脂
10 Fmoc アミド樹脂；4-(2', 4' -dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl) phenoxyacetamido-ethyl 樹脂
PAM 樹脂；phenylacetamidoethyl 樹脂
HBTU ; 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium Hexafluorophosphate
15 TBTU ; 2-(1H-bezotriazole-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium tetrafluoroborate
HOEt ; 1-hydroxybezotriazole
DCC ; dicyclohexylcarbodiimide
DIPCI ; diisopropylcarbodiimide
20 TFA ; trifluoroacetic acid
DIPEA ; diisopropylethylamine
TIPS ; triisopropylsilane
Fmoc ; fluorenylmethoxycarbonyl
Boc ; *t*-butyloxycarbonyl
25 Trt ; trityl
Bu^t ; *t*-butyl

Pmc ; 2, 2, 5, 7, 8-pentamethylchroman-6-sulfonyl
 Prl ; propionyl
 PhPrl ; phenylpropionyl
 Bzl ; benzyl
 5 Bom ; benzyloxymethyl
 Tos ; toluenesulfonyl
 Cl-Z ; 2-chloro-benzyloxycarbonyl
 Pis ; 2-phenylisopropyl
 Mtt ; 4-methyltrityl
 10 DMF ; *N,N*-dimethylformamide
 NMP ; *N*-methylpyrrolidone
 DMAP ; 4-dimethylaminopyridine
 HO₂C ; *N*-hydroxysuccinimide
 Adod ; 2-aminododecanoic acid
 15 Aib ; 2-aminoisobutylic acid
 Ape ; 5-aminopentanoic acid
 Cha ; cyclohexylalanine
 Dap ; 2, 3-diaminopropionic acid
 Nal ; naphtylalanine
 20 Nle ; norleucine

[合成に使用した保護アミノ酸]

Fmoc 法 :

Boc-Gly, Fmoc-Gly, Fmoc-Ser(Bu^t), Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Glu(Obu^t),
 Fmoc-His(Boc), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Arg(Pmc), Fmoc-Lys(Boc),
 25 Fmoc-Pro, Fmoc-Leu, Fmoc-Ala, Fmoc-Val, Fmoc-Phe, Fmoc-^DPhe,
 Fmoc-Ser(*n*-C₈H₁₇), Fmoc-^DSer(*n*-C₈H₁₇), Fmoc-Cys(*n*-C₈H₁₇),

Fmoc-Asp(0Pis), Fmoc-Ser(Bzl), Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Dap(Octanoyl),
 Fmoc-2^LNaI, Fmoc-2^DNaI, Fmoc-Nle, Fmoc-Lys(Mtt), Fmoc-Aib-OH,
 Fmoc-Asp(0-C₇H₁₅)

Boc 法 :

5 Boc-Gly, Boc-Ser(Bzl), Boc-Ser(Ac), Boc-Ser(Pr1), Boc-Glu(0Bzl),
 Boc-His(Bom), Boc-Gln, Boc-Arg(Tos), Boc-Lys(C1-Z), Boc-Pro,
 Boc-Leu, Boc-Ala, Boc-Val, Boc-Phe, Boc-Cys(n-C₈H₁₇), Boc-Ape
 Boc-Ser(n-C₈H₁₇)

〔使用した機器〕

10 (a) 分析用 HPLC システム

機器 ; 島津 LC-10A システム

カラム ; YMC PROTEIN-RP (4.6 mmφ x 150 mm)

カラム温度 ; 40°C

溶出液 ; 0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル濃度を 20 分間で 0%

15 から 50% に直線的に変化させた。

流速 ; 1 mL/分

検出 ; UV(210 nm)

注入量 ; 10~100 μl

(b) 分取用 HPLC システム

20 機器 ; Waters 600 Multisolvent Delivery System

カラム ; YMC-Pack-ODS-A (5 μm, 20 mm x 250 mm)

YMC-Pack-PROTEIN-RP (5 μm, C4, 10 mm x 250mm)

YMC-Pack PROTEIN-RP (5 μm, C4, 20 mm x 250mm)

YMC PROTEIN-RP (4.6 mmφ x 150 mm)

25 溶出液 ; 0.1% トリフルオロ酢酸中、適宜アセトニトリル濃度を直線的に
 变化させた。

流速；10 mL/分（内径 20 mm カラム用）、3 mL/分（内径 10 mm カラム用）、
1 mL/分（内径 4.6 mm カラム用）

検出；210 nm, 260 nm

注入；10~2000 μ l, 2000 μ L 以上はポンプにより注入した。

5 (c) 質量分析機

機器；フィニガン MAT TSQ700

イオン源；ESI

検出イオンモード；positive

スプレー電圧；4.5kV

10 キャピラリー温度；250°C

移動相；0.2%酢酸・メタノール混液（1：1）

流速；0.2 mL/分

スキャン範囲；m/z 300~1,500

(d) アミノ酸配列分析

15 機器；パーキンエルマー社製 アプライドバイオシステム 477A、492
型シーケンサー

(e) アミノ酸組成分析

機器；日立製作所製 L-8500 型アミノ酸分析機計

試料；とくに記載のないものは、封管中、6M 塩酸で 110°C、24 時間加水

20 分解した。

(2) アシルセリンまたはアシルトレオニンを有する誘導体の合成例
(Fmoc 法、カルボキシル末端カルボン酸)

化合物 1 hGhrelin: GSS(CO-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-樹脂 (ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol) を 20%ピペラ

25 ジンで 20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入
とピペラジンによる脱 Fmoc を繰り返し、

Fmoc-Ser(Bu¹)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu¹)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu¹)-Ser(Bu¹)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-樹脂を構築した。最後に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂 (1.3 g) を 1%TFA-5%TIPS-塩化メチレン溶液 (15 mL) で 30 分間処理した。ペプチド樹脂をろ取し、塩化メチレン (30 mL) で数回洗浄した後、5% DIEA (10 mL)、ついで塩化メチレン (30 mL) で洗浄した。得られた脱 Trt ペプチド樹脂 (約 1.3 g) を NMP (10 mL) に膨潤させ、DMAP (61.1 mg, 0.5 mmol) 存在下、オクタン酸 (144.2 mg, 1.0 mmol)、DIPCI (126.2 mg, 1.0 mmol) を加え 8 時間反応させた。樹脂をろ取し、NMP、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、3 位セリン側鎖がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂 約 1.2 g を得た。このものに、88% TFA-5%フェノール-2% TIPS-5% H₂O からなる脱保護試薬 (10 mL) を加え、室温で 2 時間攪拌した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とした。沈殿をろ取、乾燥し、粗ペプチド約 550 mg を得た。本品 200 mg を水 10 mL に溶かし、YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250 mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 54% までの 60 分間直線グラジエント (流速: 10 mL/min) で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、120 mg の目的物を得た。

(3) アシルセリンまたはアシルトレオニンを有する誘導体の合成例 (Fmoc 法、カルボキシル末端アミド体)

化合物 3 Ghrelin(1-9)-NH₂; GSS(CO-C₇H₁₅)FLSPEH-NH₂
Fmoc-アミド樹脂 (ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol) を 20% ピペラジンで 20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱 Fmoc を繰り返し、
Fmoc-Ser(Bu¹)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(Bu¹)-Pro-Glu(OBu¹)-His(Boc)-樹

脂を構築した。最後に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂（約 550 mg）を 1%TFA-5%TIPS-塩化メチレン溶液（10 mL）で 30 分間処理した。ペプチド樹脂をろ取し、塩化メチレン（30mL）で数回洗浄した後、5% DIEA（10mL）、ついで塩化メチレン（30mL）で洗浄した。得られた脱 Trt ペプチド樹脂（約 750 mg）を NMP（10 mL）に膨潤させ、DMAP（61.1 mg, 0.5 mmol）存在下、オクタン酸（144.2 mg, 1.0 mmol）、DIPCI（126.2 mg, 1 mmol）を加え 4 時間反応させた。樹脂をろ取し、NMP、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、3 位セリン側鎖がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂 約 800 mg を得た。このものに、TFA（10 mL）を加え、室温で 30 分間攪拌した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とした。沈殿をろ取、乾燥し、粗ペプチド 250 mg を得た。本品約 200 mg を 30%酢酸水 10 mL に溶かし、YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0%から 54%までの 60 分間直線グラジエント（流速:10 mL/min）で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、150 mg の目的物を得た。

（4）アシルセリンまたはアシルトレオニンを有する誘導体の合成例
(Boc 法)

化合物 9 [Ser³(Propionyl)]-rGhrelin(1-28)；

GSS(CO-CH₂CH₃)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR

Boc-Arg(Tos)-Pamレジン（0.75 g, 0.5 mmol）より、保護ラットグレリン樹脂（4-28）をBoc Chemistryで構築後、その半量1.4 gに、Boc-Ser(CO-CH₂CH₃)-OH, Boc-Ser(Bz1)-OH, Boc-Gly-OHを縮合した。得られた樹脂1.5 gをHF:p-クレゾール（8.5 mL : 1.5 mL）で0 °C、一時間処理後、HFを減圧下留去した。残さにエーテルを加え671 mgの粗ペプチドを得た。このものを50%酢酸（AcOH）に溶かし、分取用カラム YMC-Pack-ODS-A (5 μm, 20 mm x 250 mm) に添加し、10 mL/minで0.1% TFA

を含む溶液でアセトニトリル濃度を 7 5 分間で 0 から 9 5 %まで変化させて溶出した。目的物を含む画分を凍結乾燥して粗ペプチドを 135.8 mg 得た。この一部 0.5 mg を YMC-A-302 カラム (C18, 4.6 mm x 150 mm) に添加し、流速 1 mL/min でアセトニトリル濃度を 1 5 %から 1 9 %まで変化させて溶出した。この精製操作を繰り返し、目的とする画分を合わせ目的物 0.41 mg を得た。

以下のアシルセリンまたはアシルトレオニンを有するペプチド誘導体は、上記化合物 3 または化合物 9 の製造方法と同様にして製造した。

以下にアシルセリンまたはアシルトレオニンを有するペプチド誘導体の質量分析、アミノ酸組成分析結果をまとめた。

化合物 1. hGhrelin

ESI-MS 3371.0 (理論値 3370.9), アミノ酸組成比: Ser; 3.53 (4), Glx; 5.91 (6), Gly; 1.02 (1), Ala; 1.00 (1), Val; 0.96 (1), Leu; 2, Phe; 1.06 (1), Lys; 3.90 (4), His; 0.97 (1), Arg; 2.87 (3), Pro; 3.87 (4)

化合物 3. Ghrelin(1-9)-amide

ESI-MS [M+H]; 1085.7 (理論値 1085.2), アミノ酸組成比: Ser; 2.45 (3), Glx; 0.98 (1), Gly; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 0.99 (1), His; 1.08 (1), Pro; 0.97 (1)

化合物 4. [Ser²(Octanoyl), Ser³]-Ghrelin(1-9)-amide

ESI-MS [M+H]; 1085.8 (理論値 1085.2), アミノ酸組成比: Ser; 2.46 (3), Glx; 0.98 (1), Gly; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), His; 1.09 (1), Pro; 0.97 (1)

化合物 5. [Ser²(Octanoyl)]-Ghrelin(1-9)-amide

ESI-MS [M+H]; 1211.7 (理論値 1211.4), アミノ酸組成比: Ser; 2.48 (3), Glx; 1.00 (1), Gly; 1.01 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), His; 1.11 (1), Pro; 0.98 (1)

化合物 8. [Ser³ (Acetyl)]-rGhrelin

ESI-MS 3231.0 (理論値 3230.7), アミノ酸組成比: Ser; 3.50 (4), Glx;

5.90 (6), Gly ; 0.98 (1), Ala; 2.00 (2), Leu; 2, Phe; 1.01 (1), Lys;
4.97 (5), His; 0.99 (1), Arg; 1.99 (2), Pro; 3.99 (4)

化合物 9. [Ser³ (Propionyl)]-rGhrelin

ESI-MS 3245.0 (理論値 3242.8), アミノ酸組成比: Ser; 3.42 (4), Glx;
5 5.93 (6), Gly ; 1.00 (1), Ala; 2.00 (2), Leu; 2, Phe; 1.10 (1), Lys;
4.97 (5), His; 0.99 (1), Arg; 1.99 (2), Pro; 3.83 (4)

化合物 15. [Ser³ (3-Phenylpropionyl)]-hGhrelin

ESI-MS 3377.0 (理論値 3376.9), アミノ酸組成比: Ser; 3.06 (4),
Glx; 5.92 (6), Gly ; 0.93 (1), Ala; 0.98 (1), Val; 0.99 (1), Leu;
10 2, Phe; 1.13 (1), Lys; 4.03 (4), His; 1.08 (1), Arg; 3.00 (3), Pro;
3.76 (4)

化合物 16. [Ser³ (3-Octenoyl)]-hGhrelin

ESI-MS 3369.0 (理論値 3368.9), アミノ酸組成比: Ser; 3.59 (4), Glx;
5.91 (6), Gly ; 1.00 (1), Ala; 1.02 (1), Val; 0.99 (1), Leu; 2, Phe;
15 1.15 (1), Lys; 3.97 (4), His; 0.98 (1), Arg; 2.93 (3), Pro; 3.88 (4)

化合物 28. Ghrelin(1-8)-amide

ESI-MS [M+H] 948.5 (理論値 948.1), アミノ酸組成比: Ser; 2.45 (3),
Glx; 0.97 (1), Gly ; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Pro; 0.97 (1)

化合物 29. Ghrelin(1-7)-amide

20 ESI-MS [M+H] 819.6 (理論値 819.0), アミノ酸組成比: Ser; 2.52 (3),
Gly ; 1.01 (1), Leu; 1, Phe; 1.02 (1), Pro; 1.09 (1)

化合物 30. Ghrelin(1-6)-amide

ESI-MS [M+H] 722.4 (理論値 721.8), アミノ酸組成比: Ser; 2.47 (3),
Gly ; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1)

25 化合物 31. Ghrelin(1-5)

ESI-MS [M+H] 636.5 (理論値 635.8), アミノ酸組成比: Ser; 1.78 (2),
Gly ; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 1.02 (1)

化合物 32. Ghrelin(1-5)-amide

ESI-MS [M+H] 635.4 (理論値 634.8), アミノ酸組成比: Ser; 1.67 (2),
Gly; 1.01 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1),

化合物 33-2. Ghrelin(1-4)-amide

ESI-MS [M+H] 522.2 (理論値 521.6), アミノ酸組成比: Ser; 1.65 (2),

5 Gly; 0.99 (1), Phe; 1

化合物 34. Ghrelin(1-3)-amide

ESI-MS [M+H] 375.2 (理論値 374.4), アミノ酸組成比: Ser; 1.66 (2),

Gly; 1

化合物 35. [Lys⁸]-Ghrelin(1-8)-amide

10 ESI-MS [M+H] 947.9 (理論値 947.1), アミノ酸組成比: Ser; 2.70 (3),

Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Lys; 0.99 (1), Pro; 1.00 (1)

化合物 36. [Arg⁸]-Ghrelin(1-8)-amide

ESI-MS [M+H] 975.8 (理論値 975.2), アミノ酸組成比: Ser; 2.70 (3),

Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Arg; 0.99 (1), Pro; 1.00 (1)

15 化合物 37. [Lys⁶]-Ghrelin(1-6)-amide

ESI-MS [M+H] 763.6 (理論値 762.9), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2),

Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Lys; 1.00 (1)

化合物 38. [Lys⁵]-Ghrelin(1-5)-amide

ESI-MS [M+H] 650.5 (理論値 649.8), アミノ酸組成比: Ser; 1.79 (2),

20 Gly; 0.99 (1), Phe; 1, Lys; 0.99 (1)

化合物 39. [^dPhe⁴, Lys⁵]-Ghrelin(1-5)-amide

ESI-MS [M+H] 650.5 (理論値 649.8), アミノ酸組成比: Ser; 1.79 (2),

Gly; 0.99 (1), Phe; 1, Lys; 0.99 (1)

化合物 40. [N-Aminopentanoyl]-Ghrelin(3-7)-amide

25 ESI-MS [M+H] 774.7 (理論値 774.0), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2),

Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Pro; 1.00 (1)

化合物 43. [N-Glycyl]-Ghrelin(3-7)-amide

ESI-MS [M+H]; 732.7 (理論値 731.9), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2),

Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Pro; 1.00 (1)

30 化合物 44. [Leu²]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]; 845.7 (理論値 845.1), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2),

Gly ; 1.01 (1), Leu; 2, Phe; 1.02 (1), Pro; 0.99 (1)

化合物 45. [His²]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H] ; 869.7 (理論値 869.0), プロピオン酸・塩酸(50/50)で

150°C, 2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.02 (2), Gly ; 1.00

5 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), His; 0.95 (1), Pro; 0.99 (1)

化合物 46. [Lys²]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H] ; 860.7 (理論値 860.1), プロピオン酸・塩酸(50/50)で

150°C, 2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.04 (2), Gly ; 1.00

(1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Lys; 1.00 (1), Pro; 1.00 (1)

10 化合物 47. [Gly²]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H] ; 789.5 (理論値 788.9), プロピオン酸・塩酸(50/50)で

150°C, 2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.14 (2), Gly ; 2.01

(2), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Pro; 1.00 (1)

化合物 59. [Thr³(Octanoyl)]-hGhrelin

15 ESI-MS M; 3384.0 (理論値 3384.9) アミノ酸組成比 : Ala ; 1.02

(1), Arg ; 2.99 (3), Glx ; 5.91 (6), Gly ; 1.02 (1), His ; 1.00

(1), Leu ; 2 (2), Lys ; 4.05 (4), Phe ; 1.00 (1), Pro ; 4.06

(4), Ser ; 2.66 (3), Thr; 0.94 (1), Val ; 0.96 (1)

化合物 60. [Leu², Thr³(Octanoyl)]-hGhrelin

20 ESI-MS M; 3410.0 (理論値 3411.0) アミノ酸組成比 : Ala ; 1.01

(1), Arg ; 2.95 (3), Glx ; 5.92 (6), Gly ; 1.01 (1), His ; 1.01

(1), Leu ; 3 (3), Lys ; 4.02 (4), Phe ; 1.01 (1), Pro ; 4.00

(4), Ser ; 1.81 (2), Thr; 0.96 (1), Val ; 0.97 (1)

化合物 69. [Ser³(4-Methylpentanoyl)]-hGhrelin

25 ESI-MS M; 3343.0 (理論値 3342.9) アミノ酸組成比: Ala ; 1.00 (1),

Arg ; 2.97 (3), Glx ; 5.86 (6), Gly ; 1.02 (1), His ; 1.01 (1), Leu ;

2, Lys ; 4.00 (4), Phe ; 1.01 (1), Pro ; 3.99 (4), Ser ; 3.54

(4), Val ; 0.98 (1)

化合物 75. [Lys⁷]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]⁺ ; 850.5 (理論値 850.0), アミノ酸組成比 : Ser; 2.67 (3), Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Lys; 1.00 (1)

(5) アミノ末端アシリル化誘導体の合成例

5 化合物 6. [N-Octanoyl, Ser³]-Ghrelin(1-9)-amide;

Fmoc-アミド樹脂 (ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol) を 20% ピペラジンで 20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱 Fmoc を繰り返し、

10 Fmoc-Gly-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-樹脂を構築した。ピペラジン処理後、得られたペプチド樹脂 (550 mg) を NMP で洗浄し、HOBt (135.1 mg, 1 mmol) 存在下、DIPCI (126.2 mg, 1 mmol) とオクタン酸 (144.2 mg, 1.0 mmol) を加え 4 時間反応させた。樹脂をろ取し、NMP、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、アミノ末端 Gly 15 アミノ基がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂 約 600 mg を得た。

16 TFA (10 mL) で脱保護し (30 分間処理)、粗ペプチド 200 mg を得た。全量を YMC-Pack PROTEIN-RP (5 μm, C4, 20 mm x 250 mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 54% までの 60 分間直線グラジェント (流速: 10 mL/mL) で溶出させた。約 180 mg の目的物を得た。

20 測定値 ESI-MS [M+H]⁺ ; 1085.6 (理論値 1085.2)、アミノ酸組成比 : Ser; 2.47 (3), Glx; 0.98 (1), Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.02 (1), His; 1.09 (1), Pro; 0.96 (1)

(6) 側鎖アルキルセリンを含む誘導体の合成例

化合物 50. [Ser³(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide; GSS(C₈H₁₇)FLSP-NH₂25 Fmoc-Ser(C₈H₁₇)

冰冷下、Boc-Ser (12.3 g, 53.9 mmol) の DMF (300 mL) 溶液に水素化ナ

トリウム(3.19g, 133 mmol)を加え、室温で1.5時間攪拌した。この中に、ヨウ化オクタン(11.0 ml, 60.9 mmol)を加え、室温で16時間攪拌した。氷冷下、反応液に水(40 ml)を滴下した後、溶媒を減圧留去した。得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ゲル; Merck 社製 Art9385、溶出溶媒; ジクロロメタン:メタノール:酢酸=120:10:1)に付して精製し、Boc-Ser(C₈H₁₇)を淡黄色油状物として6.88 g(収率36.2%)得た。このBoc-Ser(C₈H₁₇)(6.88 g, 21.7 mmol)に氷冷下、トリフルオロ酢酸(120 ml)を加え、室温で0.5時間攪拌した。トリフルオロ酢酸を減圧留去した後、得られた残査をジエチルエーテル(120 ml)に溶10解し、4N塩酸-ジオキサン(22 ml)を加え、氷冷下、1時間攪拌した。析出した結晶をろ取り、H-Ser(C₈H₁₇)・HClを無色結晶として5.23 g(収率96.3%)得た。このH-Ser(C₈H₁₇)・HCl(2.54 g, 10.0 mmol)の10%炭酸水素ナトリウム(50 ml)懸濁液にトリエチルアミン(1.40 ml, 10 mmol)を加えた後、この中にFmoc-OSu(5.00 g, 14.8 mmol)の1,2-ジメトキシエタン(20 ml)溶液を10分間かけて滴下し、室温で16時間攪拌した。不溶物をろ過し、ろ液にジクロロメタンを加え有機層を分離した後、13%食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ゲル; 富士シリシア社製 BW-300、溶出溶媒; ジクロロメタン:メタノール=93:20)に付して精製し、Fmoc-Ser(C₈H₁₇)を無色結晶として2.75 g(収率62.6%)得た。Rf=0.45 (CHCl₃:MeOH=9:1, Silica gel 60F₂₅₄, MERCK) Fmoc-^DSer(C₈H₁₇):Rf=0.45 (CHCl₃:MeOH=9:1, Silica gel 60F₂₅₄, MERCK) Fmoc-アミド樹脂(ABI社製、400 mg, 0.25 mmol)を20%ピペラジンで20分間処理したのち、順次HBTU/HOBtによるFmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱Fmocを繰り返し、25 Fmoc-Ser(Bu^t)-Ser(C₈H₁₇)-Phe-Leu-Ser(Bu^t)-Pro樹脂を構築した。最後

に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂 から 250 mg をとり TFA (10 mL) で 30 分間処理した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とし粗ペプチド約 120 mg を得た。本品を 5% AcOH (10 mL) に溶かし、YMC-Pack-ODS-A (5 μ m, 20 mm x 250 mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 60% までの 60 分間直線グラジエント (流速: 10 mL/min) で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、40 mg の目的物を得た。

化合物 84. [N-Aminopentanoyl, Ser³(Octyl)]-Ghrelin(3-5)-benzyl amide ;

10 H-Ape-Ser(C₈H₁₇)-Phe-Leu-NH-CH₂-Ph

オキシム樹脂 (230 mg/0.25 mmol, Novabiochem 製) をグラスフィルター付反応容器に入れ、予め塩化メチレン (DCM) に溶かし、MgSO₄ で乾燥した Boc-Leu-OH · H₂O (190 mg, 0.75 mmol)、DCC (160 mg, 0.75 mmol)、および DCM 5 mL を加え、終夜振盪した。適量の DCM、DCM / EtOH=1:1、DCM で順次数回ずつ洗浄した。Leu 導入後は、① 25% TFA / DCM 10 mL を加え 30 分振盪した後、DCM、イソプロピルアルコール (iPrOH)、DCM、DMF でそれぞれ数回洗浄する、② 三角フラスコ中で Boc アミノ酸 0.75 mmol (3 当量)、TBTU 0.75 mmol (3 当量)、HOBt 0.75 mmol (3 当量) を DMF 5 mL に溶解し、DIPEA 1.25 mmol (5 当量) を加え攪拌したものを反応容器に入れ 1 時間振盪する、という操作を繰り返し、順次アミノ酸を縮合した。最終的に Boc-NH-(CH₂)₄-CO-Ser(C₈H₁₇)-Phe-Leu-Oxime 樹脂 370 mg を得た。DMF 約 5 mL 中に懸濁させ、ベンジルアミン塩酸塩 (180 mg, 1.25 mmol)、トリエチルアミン (173 μ L, 1.25 mmol)、酢酸 72 μ L (1.25 mmol) を加え攪拌した。24 時間後、樹脂を濾去し、濾液を減圧留去し、1N HCl 10 mL で Boc 保護体を析出させた。水洗、乾燥後、TFA 5 mL を加え 30 分反応させ脱 Boc を行った。TFA を減圧留去し、エーテル (Et₂O) で

沈殿させ、目的物 [*N*-Aminopentanoyl, Ser³(Octyl)]-Ghrelin(3-5)-benzylamide 110 mg を得た。同様の方法で化合物 82、83、85 を合成した。

5 以下のアルキルセリンを有するペプチド誘導体は、化合物 82～85 を除き、上記化合物 50 の製造方法と同様にして製造した。

以下にアルキルセリンを有するペプチド誘導体の質量分析、アミノ酸組成分析結果をまとめた。

化合物 17. [Ser³(Octyl)]-hGhrelin

10 ESI-MS ; 3357.0 (理論値; 3356.9)、アミノ酸組成比: Ser; 2.92 (3+1), Glx; 5.94 (6), Gly; 1.00 (1), Ala; 0.98 (1), Val; 0.99 (1), Leu; 2, Phe; 1.13 (1), Lys; 4.04 (4), His; 1.09 (1), Arg; 3.01 (3), Pro; 3.89 (4)

化合物 50. [Ser³(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide

15 ESI-MS [M+H]; 805.5 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で 150℃, 2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 0.86 (2+1), Gly; 1.01 (1), Leu; 1, Phe; 1.06 (1), Pro; 0.95 (1)

化合物 51. [Ser³(Octyl), ^DPhe⁴]-Ghrelin(1-7)-amide

20 ESI-MS [M+H]; 805.4 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で 150℃, 2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 0.97 (2+1), Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.05 (1), Pro; 1.16 (1)

化合物 52. [^DSer³(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide

25 ESI-MS [M+H]; 805.4 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で 150℃, 2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.51 (2+1), Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Pro; 1.00 (1)

化合物 53. [^DSer³(Octyl), ^DPhe⁴]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]; 805.5 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)

で 150℃, 2 時間加水分解後のアミノ酸組成比 : Ser; 1.51 (2+1), Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Pro; 1.01 (1)

化合物 67. [Ser³(Bz1)]-hGhrelin

ESI-MS M; 3335.0 (理論値 3334.8) アミノ酸組成比 : Ala ; 1.00 (1), Arg ; 2.96 (3), Glx ; 5.92 (6), Gly ; 1.00 (1), His ; 1.01 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 4.00 (4), Phe ; 1.02 (1), Pro ; 4.08 (4), Ser ; 3.58 (4), Val ; 0.98 (1)

化合物 76. [N-Aminopentanoyl, Ser³(Octyl), Lys⁵]-Ghrelin(3-5)-amide

ESI-MS [M+H] ; 591.5 (理論値 590.8), アミノ酸組成比 : Ser; 0.45 (1), Phe; 1, Lys; 1.00 (1)

化合物 77. [N-Aminopentanoyl, ^DSer³(Octyl), ^DPhe⁴, Lys⁵]-Ghrelin(3-5)-amide

ESI-MS [M+H] ; 591.5 (理論値 590.8), アミノ酸組成比 : Ser; 0.45 (1), Phe; 1, Lys; 1.01 (1)

化合物 78. [Aib¹, His², Ser³(Octyl), Lys⁵]-Ghrelin(1-5)-amide

ESI-MS [M+H] ; 714.6 (理論値 713.9), アミノ酸組成比 : Ser; 0.45 (1), Phe; 1, His; 1.01 (1), Lys; 1.00 (1)

化合物 79. [Aib¹, His², ^DSer³(Octyl), ^DPhe⁴, Lys⁵]-Ghrelin(1-5)

-amide

ESI-MS [M+H] ; 714.5 (理論値 713.9), アミノ酸組成比 : Ser; 0.44 (1), Phe; 1, His; 1.00 (1), Lys; 1.01 (1)

化合物 81. [N-Aminopentanoyl, Ser³(Octyl)]-Ghrelin(3-5)-amide

ESI-MS [M+H] ; 576.5 (理論値 575.8), アミノ酸組成比 : Ser; 0.49 (1),

Leu; 1, Phe; 0.99 (1)

化合物 82. [N-Aminopentanoyl, Ser³(Octyl)]-Ghrelin(3-5)

-methylamide

ESI-MS [M+H] ; 590.6 (理論値 589.8), アミノ酸組成比 : Ser; 0.49 (1),
Leu; 1, Phe; 0.99 (1)

化合物 83. [N-Aminopentanoyl, Ser³(Octyl)]-Ghrelin(3-5)

5 -ethylamide

ESI-MS [M+H] ; 604.3 (理論値 603.8), アミノ酸組成比 : Ser; 0.50 (1),
Leu; 1, Phe; 0.99 (1)

化合物 84. [N-Aminopentanoyl, Ser³(Octyl)]-Ghrelin(3-5)

-benzylamide

10 ESI-MS [M+H] ; 666.5 (理論値 665.9), アミノ酸組成比 : Ser; 0.46 (1),
Leu; 1, Phe; 0.98 (1)

化合物 85. [N-Aminopentanoyl, Ser³(Octyl)]-Ghrelin(3-5)

-aminoethylamide

15 ESI-MS [M+H] ; 619.6 (理論値 618.9), アミノ酸組成比 : Ser; 0.47 (1),
Leu; 1, Phe; 0.99 (1)

(7) 側鎖アルキルシステインを含む誘導体の合成例

化合物 48. [Cys³(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-NH₂; GSC(C₈H₁₇)FLSP-NH₂

20 Fmoc-アミド樹脂 (ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol) を 20%ピペラジンで
20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入とピペ
ラジンによる脱 Fmoc を繰り返し、
Fmoc-Ser(Bu¹)-Cys(C₈H₁₇)-Phe-Leu-Ser(Bu¹)-Pro 樹脂を構築した。最後
に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂
(550 mg)を TFA (10 mL) で 30 分間処理した。樹脂をろ去し、ろ液を
濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とし粗ペプチド 120 mgを得た。本品
25 を 5%酢酸 (AcOH) 10 mL に溶かし、YMC-Pack-ODS-A (5 μm, 20 mm x 250
mm)に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0%から 60%ま

での 60 分間直線グラジェント（流速:10 mL/min）で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、44 mg の目的物を得た。

化合物 68. [Cys³(Trt)]-hGhrelin;

GSC(C-Ph₃)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

5 Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-樹脂（ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol）を 20% ピペラジンで 20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱 Fmoc を繰り返し、
10 Fmoc-Ser(Bu¹)-Cys(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(0Bu¹)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(0Bu¹)-Ser(Bu¹)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-
15 Pro-Arg(Pmc)-HMP 樹脂を構築した。最後に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂（1.4 g）を得た。このうち 400 mg に TFA(15mL) を加え、室温で 1 時間攪拌した。ろ過して樹脂を除き、ろ液を濃縮した後、エーテルを加え沈殿とした。約 90 mg を水 40 mL に溶かし、YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 54% までの 60 分間直線グラジェント（流速:10 mL/min）で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、60 mg の目的物を得た。

20 以下のアルキルシスティンを有するペプチド誘導体は、上記化合物 4 または化合物 68 の製造方法と同様にして製造した。

以下にアルキルシスティンを有するペプチド誘導体の質量分析、アミノ酸組成分析結果をまとめた。

化合物 18. [Cys³ (Octyl)]-rGhrelin

25 ESI-MS ; 3317.0 (理論値: 3316.9)、アミノ酸組成比: Ser; 2.69 (3), Glx; 5.90 (6), Gly; 1.00 (1), Ala; 1.99 (2), Leu; 2, Phe; 1.02 (1),

Lys; 4.97 (5), His; 0.99 (1), Arg; 1.98 (2), Pro; 3.87 (4)

化合物 48. [Cys³ (Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]; 821.7 (理論値 821.1) 、プロピオン酸・塩酸(50/50)で 150°C 、2 時間加水分解後アミノ酸組成比: Ser; 0.60 (2), Gly; 1.08 (1), Leu; 1, Phe; 1.06 (1), Pro; 0.96 (1)

化合物 49. [Cys³ (Octyl), ^DPhe⁴]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]; 821.6 (理論値 821.1) 、プロピオン酸・塩酸(50/50)で 150°C 、2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 0.58 (2), Gly; 1.02 (1), Leu; 1, Phe; 1.06 (1), Pro; 0.97 (1)

化合物 68. [Cys³(Trt)]-hGhrelin

ESI-MS 3503.0 (理論値 3503.1) , アミノ酸組成比: Ser; 2.42 (3), Glx; 5.77 (6), Gly; 1.00 (1), Ala; 1.01 (1), Val; 0.94 (1), Leu; 2, Phe; 0.99 (1), Lys; 3.94 (4), His; 0.99 (1), Arg; 2.92 (3), Pro; 3.81 (4)

(8) N-メチルアミノ酸を含むペプチド誘導体の合成例

化 合 物 86. [N-Aminopentanoyl, Ser³(Octyl), MePhe⁴, MeLeu⁵]-Ghrelin(3-5)-amide; NH₂-(CH₂)₄-CO-Ser(C₈H₁₇)-MePhe-MeLeu-NH₂

Fmoc-アミド樹脂 (0.40 g, 0.25 mmol) をグラスフィルター付反応容器に入れ、20% ピペリジン / NMP 15mL を加え 20 分振盪し、Fmoc 基を除去した。その後、NMP 15mL、Fmoc-MeLeu-OH 1.0 mmol (4 当量)、TBTU 1.0 mmol (4 当量)、HOBr 1.0 mmol (4 当量)、DIPEA 1.0 mmol (4 当量) を加え 1 時間振盪し、Fmoc-MeLeu を縮合した。その後、20% ピペリジンによる Fmoc 基の除去と DIPEA 2.25 mmol (9 当量) 存在下、Bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (3 当量) による Fmoc-アミノ酸 縮合 (3 当量) を繰り返し、ペプチド鎖を延長した。縮合反応の終了を、少量の樹脂を TFA で脱保護し、HPLC および質量

分析 (MS) により確認した。Boc-NH-(CH₂)₄-CO-Ser(0-C₈H₁₇)-MePhe-MeLeu-樹脂を得た後、これを TFA で 30 分処理して切り出しありび脱保護を行い、TFA を減圧留去、エーテル (Et₂O) で洗浄し、NH₂-(CH₂)₄-CO-Ser(C₈H₁₇)-MePhe-MeLeu-NH₂ 120 mg を得た。これを 5 YMC-Pack ODS-A (C18, 20 mm x 250mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 54% までの 60 分間直線グラジエント (流速: 10 mL/min) で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、70 mg の目的物を得た。本誘導体をプロピオン酸・塩酸 (50/50) で 150°C、2 時間加水分解して、アミノ酸分析機上で検出されたアミノペンタン酸のピーク面積を、アミノペンタン酸 10 nmol に対応する面積比からペプチド量を定量した。

ESI-MS [M+H]⁺ : 604.5 (理論値 603.8) 、プロピオン酸・塩酸 (50/50) で 150°C、2 時間加水分解後の検出アミノ酸 : Ser、Ape

(9) 混合ジスルフィド誘導体の合成

15 化合物 57. [Cys³(S-Heptyl)]-hGhrelin;

GSC(S-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

化合物 58 の化合物 3 の製造方法に従った合成で得られた保護ペプチド-HMP 樹脂 (1 g) に 88% TFA-5% フェノール-2% TIPS-5% H₂O からなる脱保護試薬 (15 mL) を加え、室温で 2 時間攪拌した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え、粗 [Cys³]-hGhrelin 粉末を約 550 mg を得た。これを YMC-Pack ODS-A (C18, 20 mm x 250mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 54% までの 60 分間直線グラジエント (流速: 10 mL/min) で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、300 mg の [Cys³]-hGhrelin (1-28) を得た。そのうち 40 mg (11.4 μmol) を水 (20 mL) に溶解し、4, 4' -ジチオジピリジン (7.5 mg、34.2 μmol) のアセトニトリル溶液 1 mL を加え、1 時間放置した。反応終了を

確認した後、反応液をクロロホルムで数回洗浄し、過剰の 4, 4' -ジチオジピリジンとピリドン誘導体を除いた。 [チオピリジル Cys³]-hGhrelin(1-28)を含む水層 (10 mL) を 5%NH₃水で pH を 7.4 として、1-ペプタンチオール (4.5 mg, 34.2 μ mol) のアセトニトリル溶液 5 2mL を加えた。1 時間後、反応液を YMC-Pack ODS-A (C18, 20 mm x 250 mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0%から 54%までの 60 分間直線グラジェント (流速:10 mL/min) で溶出させた。目的画分を分取、凍結乾燥して 15 mg の目的物を得た。

化合物 57. [Cys³(S-Heptyl)]-hGhrelin

10 ESI-MS 3391.0 (理論値 3391.0), アミノ酸組成比 : Ser; 2.76 (3), Glx; 5.81 (6), Gly; 0.99 (1), Ala; 1.01 (1), Val; 0.95 (1), Leu; 2, Phe; 0.99 (1), Lys; 3.95 (4), His; 0.99 (1), Arg; 2.93 (3), Pro; 3.84 (4)

(10) 3 位側鎖にアミド、逆方向のエステルを有する誘導体の合成例

15 化合物 55. [Asp³(NH-Heptyl)]-hGhrelin;

GSD(NH-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-樹脂 (ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol) を 20%ピペラジンで 20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱 Fmoc を繰り返し、
20 Fmoc-Ser(Bu^t)-Asp(OPIs)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-HMP 樹脂を構築した。最後に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂 (1.3 g) を 4%TFA-塩化メチレン溶液 (15 mL) で 15 分間処理した。ペプチド樹脂をろ取し、塩化メチレン (30 mL) で数回洗浄した後、4% DIEA (10mL)、ついで塩化メチレン

(30mL)で洗浄した。

得られた脱 Pis ペプチド樹脂(約 1.3 g)を NMP (10 mL)に膨潤させ、水溶性カルボジイミド塩酸塩(191.7 mg, 1.0 mmol)、HOBr (135.2 mg, 1.0 mmol)、n-ペプチルアミン (115.2 mg, 1.0 mmol)を加え、8時間反応させた。

樹脂をろ取し、NMP、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、3位 Asp 側鎖がヘプチルアミド化された保護ペプチド樹脂 約 1.2 gを得た。この中に、88% TFA-5%フェノール-2% TIPS-5% H₂O からなる脱保護試薬 (10 mL)を加え、室温で2時間攪拌した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、10 残さにエーテルを加え沈殿とした。沈殿をろ取、乾燥し、粗ペプチド約 550 mgを得た。

本品 200 mgを水 10 mLに溶かし、YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250mm)に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0%から 54% までの 60 分間直線グラジェント (流速:10 mL/min) で溶出させた。目的 15 画分を分取後、凍結乾燥し、120 mg の目的物を得た。

化合物 61. [Lys³(Octanoyl)]-hGhrelin ;
 GSK(CO-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
 Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-樹脂 (ABI社製、403 mg, 0.25 mmol)を20%ピペラジンで20分間処理したのち、順次HBTU/HOBrによるFmoc-アミノ酸導入とピペ 20 ラジンによる脱 Fmoc を繰り返し
 Boc-Gly-Ser(tBu)-Lys(Mtt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu¹)-His(Boc)
 -Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu¹)-Ser(Bu¹)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-HMP樹脂を構築した。約 300mgの保護ペプチド樹脂を 25 1%TFA-5%TIPS-塩化メチレン溶液 (15 mL)で60分間処理した。
 ペプチド樹脂をろ取し、塩化メチレン(30 mL)で数回洗浄した後、10%

DIEA(10mL)、ついで塩化メチレン(30mL)で洗浄した。得られた脱Mttペプチド樹脂(約300mg)をNMP(2mL)に膨潤させ、HOBr(34mg, 0.25mmol)存在下、オクタン酸(40μl, 0.25mmol)、DCC(52mg, 0.25mmol)を加え一晩反応させた。

5 樹脂をろ取し、NMP、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、3位リジン側鎖がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂 約300mgを得た。このものに、88% TFA-5%フェノール-2% TIPS-5% H₂Oからなる脱保護試薬(5mL)を加え、室温で2時間攪拌した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とした。沈殿をろ取、乾燥し、粗ペプチド約234mgを得た。

10 本品を酢酸6mLに溶かし、YMC-Pack ODS-A(5μm, 20mm x 250mm)に添加し、0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル0%から60%までの60分間直線グラジエント(流速:10mL/min)で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、100mgのパウダーを得た。この物を2mLの50%酢酸の溶かし、YMC-Pack PROTEIN-RP(5μm, C4, 20mm x 250mm)に添加し、0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル0%から60%までの60分間直線グラジエント(流速:10mL/min)で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、52mgのパウダーを得た。

20 以下の化合物は、上記化合物55または化合物61の製造方法と同様にして製造した。

その他、Fmoc常法で合成したペプチド誘導体の質量分析、アミノ酸組成分析結果をまとめた。

化合物54. [Asp³(0-Heptyl)]-hGhrelin(1-28)

25 ESI-MS 3371.0(理論値3370.9), アミノ酸組成比: Asx; 0.99(1), Ser; 2.70(3), Glx; 5.87(6), Gly; 1.01(1), Ala; 1.01(1), Val;

0.94 (1), Leu; 2, Phe; 1.00 (1), Lys; 4.02 (4), His; 1.00 (1), Arg;
2.98 (3), Pro; 3.84 (4)

化合物 55. [Asp³(NH-Heptyl)]-hGhrelin(1-28)

ESI-MS 3370.0 (理論値 3369.9), アミノ酸組成比 : Asx; 0.88 (1),
5 Ser; 2.95 (3), Glx; 5.97 (6), Gly; 1.21 (1), Ala; 1.03 (1), Val;
0.98 (1), Leu; 2, Phe; 1.00 (1), Lys; 3.94 (4), His; 0.92 (1), Arg;
2.91 (3), Pro; 3.99 (4)

化合物 56. [Dap³(Octanoyl)]-hGhrelin

ESI-MS M; 3370.0 (理論値 3369.9) アミノ酸組成比 : Ala; 1.02
10 (1), Arg; 2.94 (3), Glx; 5.94 (6), Gly; 1.00 (1), His; 0.91
(1), Leu; 2 (2), Lys; 3.93 (4), Phe; 0.99 (1), Pro; 4.01
(4), Ser; 2.88 (3), Val; 0.98 (1), Dap; N.D.

化合物 58. [Adod³]-hGhrelin(1-28)

ESI-MS M; 3355.0 (理論値 3355.0) アミノ酸組成比 : Ala; 1.01
15 (1), Arg; 2.91 (3), Glx; 5.95 (6), Gly; 1.01 (1), His; 0.91
(1), Leu; 2 (2), Lys; 3.94 (4), Phe; 0.99 (1), Pro; 4.02
(4), Ser; 2.88 (3), Val; 0.96 (1)

化合物 61. [Lys³(Octanoyl)]-hGhrelin

ESI-MS M; 3412.0 (理論値 3412.0) アミノ酸組成比 : Ala; 1.05
20 (1), Arg; 3.05 (3), Glx; 6.02 (6), Gly; 1.00 (1), His; 1.00
(1), Leu; 2 (2), Lys; 5.11 (5), Phe; 0.97 (1), Pro; 4.20
(4), Ser; 2.68 (3), Val; 1.00 (1)

化合物 62. [Trp³]-hGhrelin

ESI-MS M; 3343.0 (理論値 3343.9), アミノ酸組成比 : Ala; 1.00 (1),
25 Arg; 3.03 (3), Glx; 5.94 (6), Gly; 1.01 (1), His; 1.01 (1), Leu;
2 (2), Lys; 4.00 (4), Phe; 0.99 (1), Pro; 3.96 (4), Ser; 2.60

(3), Trp ; N. D. , Val ; 0.98 (1)

化合物 63. [Phe³]-hGhrelin

ESI-MS M; 3305.0 (理論値 3304.8), アミノ酸組成比 : Ala ; 0.99 (1), Arg ; 2.96 (3), Glx ; 5.86 (6), Gly ; 1.00 (1), His ; 1.00 (1), Leu ; 5 2 (2), Lys ; 3.98 (4), Phe ; 2.01 (2), Pro ; 3.99 (4), Ser ; 2.67 (3), Val ; 0.98 (1)

化合物 64. [Cha³]-hGhrelin

ESI-MS M; 3411.0 (理論値 3410.9), アミノ酸組成比 : Ala ; 1.02 (1), Arg ; 3.01 (3), Glx ; 5.92 (6), Gly ; 1.01 (1), His +Cha ; 2.01 (1+1), 10 Leu ; 2 (2), Lys ; 4.02 (4), Phe ; 1.01 (1), Pro ; 4.03 (4), Ser ; 2.72 (3), Val ; 0.97 (1)

化合物 65. [2-^LNa¹³]-hGhrelin

ESI-MS M; 3354.0 (理論値 3354.9), アミノ酸組成比 : Ala ; 1.00 (1), Arg ; 2.95 (3), Glx ; 5.87 (6), Gly ; 1.02 (1), His ; 1.01 (1), Leu ; 15 2 (2), Lys ; 3.98 (4), Phe ; 1.01 (1), Pro ; 3.94 (4), Ser ; 2.73 (3), Val ; 0.97 (1), Na¹ ; N. D. (1)

化合物 66. [2-^DNa¹³]-hGhrelin

ESI-MS M; 3355.0 (理論値 3354.9), アミノ酸組成比 : Ala ; 1.02 (1), Arg ; 2.95 (3), Glx ; 5.96 (6), Gly ; 1.00 (1), His ; 0.92 (1), Leu ; 20 2 (2), Lys ; 3.94 (4), Phe ; 0.99 (1), Pro ; 4.02 (4), Ser ; 2.91 (3), Val ; 0.98 (1), Na¹ ; N. D. (2)

化合物 70. [Leu³]-hGhrelin

ESI-MS M; 3270.0 (理論値 3270.8), アミノ酸組成比 : Ala ; 0.99 (1), Arg ; 2.95 (3), Glx ; 5.88 (6), Gly ; 1.01 (1), His ; 1.00 (1), Leu ; 25 3 (3), Lys ; 3.96 (4), Phe ; 1.00 (1), Pro ; 3.89 (4), Ser ; 2.65 (3), Val ; 0.97 (1)

化合物 71. [Ile³]-hGhrelin

ESI-MS M; 3270.0 (理論値 3270.8), アミノ酸組成比 : Ala ; 0.98 (1), Arg ; 2.96 (3), Glx ; 5.87 (6), Gly ; 0.99 (1), His ; 1.01 (1), Ile ; 0.98 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 3.97 (4), Phe ; 1.00 (1), Pro ; 3.97 (4), Ser ; 2.65 (3), Val ; 0.98 (1)

化合物 72. [Lys³(Octanoyl)]-hGhrelin

ESI-MS M; 3286.0 (理論値 3285.8), アミノ酸組成比 : Ala ; 1.02 (1), Arg ; 2.94 (3), Glx ; 5.95 (6), Gly ; 0.99 (1), His ; 0.92 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 4.92 (5), Phe ; 0.99 (1), Pro ; 4.02 (4), Ser ; 2.91 (4), Val ; 0.99 (1)

化合物 73. [Nle³]-hGhrelin

ESI-MS M; 3270.0 (理論値 3270.8), アミノ酸組成比 : Ala ; 1.01 (1), Arg ; 2.98 (3), Glx ; 5.92 (6), Gly ; 1.02 (1), His ; 1.01 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 4.01 (4), Phe ; 1.01 (1), Pro ; 4.01 (4), Ser ; 2.71 (3), Val ; 0.98 (1), Nle ; N.D. (1)

化合物 74. [Val³]-hGhrelin

ESI-MS M; 3256.0 (理論値 3256.8), アミノ酸組成比 : Ala ; 0.98 (1), Arg ; 2.96 (3), Glx ; 5.84 (6), Gly ; 1.00 (1), His ; 1.01 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 3.97 (4), Phe ; 0.99 (1), Pro ; 3.94 (4), Ser ; 2.64 (3), Val ; 1.97 (2)

化合物 80. [Aib¹, His², ^DNal³, ^DPhe⁴, Lys⁵]-Ghrelin(1-5)-amide; Ipamorelin

ESI-MS [M+H] ; 712.5 (理論値 711.9), アミノ酸組成比 : Phe ; 1, His ; 1.00 (1), Lys ; 1.00 (1)

実施例 10 において合成したグレリン誘導体ペプチド系化合物および天然型グレリンペプチドについて、実施例 1 に示した方法によって Ca 上昇活性を測定した。

(1) 3 位セリン側鎖の修飾

5 ア. オクタノイル基の位置

グレリンの著しい構造上の特徴は 3 位セリン水酸基のオクタノイル基である。まず、オクタノイル化されるセリンの位置が 3 位であることが活性発現に有利であるかどうかを調べた。ラット GSH レセプターを発現させた CHO 細胞を用い、細胞内カルシウム上昇作用を指標とした。

10 その EC₅₀ 値が 5.4 nM に保持された短鎖グレリン誘導体であるグレリン (1-9) アミドをもとに、[セリン² (オクタノイル), セリン³]-グレリン (1-9) アミド、[セリン² (オクタノイル)]-グレリン (1-9) アミド、および [N^α-オクタノイル, セリン³]-グレリン (1-9) アミドを合成し、細胞内カルシウム上昇活性を検討した。

15 結果を第 4 表にまとめた。

第4表

グレリン誘導体の活性 1

化合物構造	Ca 上昇活性 EC ₅₀ (nM)
1. human Ghrelin GSS (CO-C ₇ H ₁₅) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1. 3
2. rat Ghrelin GSS (CO-C ₇ H ₁₅) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	1. 5
3. Ghrelin(1-9)-amide H-Gly-Ser- Ser (CO-C ₇ H ₁₅) -Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH ₂	5. 4
4. [Ser² (Octanoyl) , Ser³]-Ghrelin(1-9)-amide H-Gly- Ser (CO-C ₇ H ₁₅) -Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH ₂	1, 100
5. [Ser² (Octanoyl)]-Ghrelin(1-9)-amide H-Gly- Ser (CO-C ₇ H ₁₅) - Ser (CO-C ₇ H ₁₅) -Phe-Leu-Ser-Pro - Glu-His-NH ₂	1, 400
6. [N-Octanoyl, Ser³]-Ghrelin(1-9)-amide C ₇ H ₁₅ CO-Gly-Leu-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro- Glu-His-NH ₂	>10, 000

ヒトグレリンのオクタノイル基を3位から2位セリンに移すと活性は
5 約1/200に低下した (EC₅₀=1, 100 nM)。

2位と3位の両方にオクタノイル基を有する誘導体も同様に活性が低下した (EC₅₀=1, 400 nM)。

また、アミノ末端アミノ基のみをN-オクタノイル化すると活性は比較的弱くなった (EC₅₀>10, 000 nM)。

10 これらの結果から、オクタノイル基で修飾されたアミノ酸の位置はグレリン分子において3位が特に好ましいことが判明した。

イ. 脂肪酸鎖長

ラットグレリン3位セリン側鎖のオクタノイル基を除去したデス-オクタノイル体の細胞内カルシウム上昇活性はオクタノイル体の 2. 6 nM

15 から 3, 500 nM に低下することから、3位セリン側鎖のオクタノイル基は活性発現に極めて重要な役割を果たしていることは明らかである。

そこで、種々の飽和脂肪酸を用い、ラットグレリンにおけるセリン側

鎖アシル基の炭素数と活性の関係を調べた。即ち、アセチル基 ($\text{CH}_3\text{CO}-$)、プロピオニル基 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}-$)、ブチリル基 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$)、ヘキサノイル基 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CO}-$)、デカノイル基 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$)、ラウロイル基 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$)、及びパルミトイル基 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$) で 3 位セリン水酸基 5 をアシル化したグレリン誘導体の細胞内カルシウム上昇活性を求めた。

結果を第 5 表にまとめた。

第 5 表

グレリン誘導体の活性 2

化合物構造	Ca 上昇活性 EC_{50} (nM)
7. [Ser ³]-rat Ghrelin GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	3, 500
8. [Ser ³ (Acetyl)]-rGhrelin GSS(CO-CH ₃)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	780
9. [Ser ³ (Propionyl)]-rGhrelin GSS(CO-C ₂ H ₅)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	n. t.
10. [Ser ³ (Butyryl)]-rGhrelin GSS(CO-C ₃ H ₇)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	280
11. [Ser ³ (Hexanoyl)]-rGhrelin GSS(CO-C ₅ H ₁₁)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	16
12. [Ser ³ (Decanoyl)]-rGhrelin GSS(CO-C ₉ H ₁₉)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	1. 7
13. [Ser ³ (Lauroyl)]-rGhrelin GSS(CO-C ₁₁ H ₂₃)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	2. 4
14. [Ser ³ (Palmitoyl)]-rGhrelin GSS(CO-C ₁₅ H ₃₁)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	6. 5

表中、n. t. は試験を行っていないことを示す。

10 脂肪酸鎖長の活性への影響は、アセチル基 (C2) で EC_{50} 値が 780 nM、ブタノイル基 (C4) で EC_{50} 値が 280 nM と次第に顕著となり、ヘキサノイル基 (C7) で EC_{50} 値が 16 nM と Ca 上昇活性がさらに上昇し、オクタノイル基 (グレリン) で EC_{50} 値が 1.5 nM と Ca 上昇活性がピークに達した。デカノイル基 (C10) でも EC_{50} が 1.7 nM と Ca 上昇活性はグレリンと同等に保持され、さらにラウロイル基 (C12) で EC_{50} 値が 2.4 nM、

パルミトイル基 (C16) でも EC₅₀ 値が 6.5 nM と脂肪酸鎖長を延ばしても Ca 上昇活性が保持された。

ウ. 種々のアシル基置換

飽和脂肪酸に替え、3-フェニルプロピオン酸 (HO-CO-CH₂CH₂Ph) を 5 芳香族脂肪酸の代表例として 3 位セリン水酸基にエステル結合させたヒトグレリン誘導体、および不飽和脂肪酸の代表例として 3-オクテン酸 (CH₃(CH₂)₃CH=CH-CH₂COOH)、分枝状脂肪酸の代表例として 4-メチルペンタン酸 ((CH₃)₂CH-CH₂CH₂CO₂H) をエステル結合させたヒトグレリン誘導体を作成し活性を評価した。

10 エ. アルキル基への置換

化学的に不安定なエステル結合をより安定なエーテル、チオエーテル結合などに変換すれば化学的に安定なグレリン誘導体の作成が可能である。しかしながら、活性が保持されることが前提であることは言うまでもない。

15 そこで、ヒトグレリンの 3 位セリンをオクチル (C₈H₁₇) 化したヒトグレリンのエーテル誘導体、およびラットグレリンの 3 位セリンをシステインに置換し、同様にオクチル化したラットグレリンのチオエーテル体の活性を調べた。

また、ヒトグレリンの 3 位セリンをベンジル化 (-CH₂Ph) した誘導体、20 およびヒトグレリンの 3 位セリンをシステインに置換しトリチル化 (-C(Ph)₃) した誘導体を作成した。

結果を第 6 表にまとめた。なお、ヒトグレリンの 3 位セリンをベンジル化 (-CH₂Ph) した誘導体、およびヒトグレリンの 3 位セリンをシステインに置換しトリチル化 (-C(Ph)₃) した誘導体の Ca 上昇活性については、25 第 1 3 表に化合物 67、68 として結果を記載した。また、4-メチルペンタン酸 ((CH₃)₂CH-CH₂CH₂CO₂H) を 3 位セリン水酸基にエステル結合させたヒトグレリン誘導体の Ca 上昇活性についても、第 1 3 表に化合物 69

として結果を記載した。

第 6 表

グレリン誘導体の活性 3

化合物構造	Ca 上昇活性 EC ₅₀ (nM)
15. [Ser ³ (3-Phenylpropionyl)]-hGhrelin GSS(CO-CH ₂ CH ₂ Ph) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1. 4
16. [Ser ³ (3-Octenoyl)]-hGhrelin GSS(CO-CH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ CH ₃) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1. 7
17. [Ser ³ (Octyl)]-hGhrelin GSS(C ₈ H ₁₇) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1. 2
18. [Cys ³ (Octyl)]-rGhrelin GSC(C ₈ H ₁₇) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	5. 4

5 不飽和脂肪酸である 3-オクテノイル基を 3 位のセリンの側鎖に導入しても、オクタノイル基と同等の Ca 上昇活性 (EC₅₀=1. 7 nM) であった。

興味深いことにフェニルプロピオニル基の導入でも、EC₅₀=1. 4 nM と Ca 上昇活性が保持され、また、分枝状脂肪酸で C6 に相当する 4-メチルペンタノイル基を導入しても、EC₅₀ 値が 4. 4 nM であり、 Ca 上昇活性が 10 保持された (第 13 表、化合物 69) ことより、 3 位セリン側鎖のアシル基は必ずしも直鎖アルカノイル基である必要がないことが明らかになった。

さらに、化学的安定性が期待できる 3 位セリンあるいはシステインをオクチル化したエーテルおよびチオエーテル体の EC₅₀ 値が、それぞれ 1. 2 nM、5. 4 nM に保持されたことより、 3 位アミノ酸残基側鎖は必ずしもアシル基である必要はないことが明らかになった。

また、3 位を Ser(Bzl) [ヒトグレリンの 3 位セリンをベンジル化 (-CH₂Ph) した誘導体]、あるいは Cys(Trt) [ヒトグレリンの 3 位セリンをシステインに置換しトリチル化 (-C(Ph)₃) した誘導体] に置換したグレリンも、EC₅₀ 値がそれぞれ 7. 6 nM、20 nM であり、 Ca 上昇活性が保

持された（第13表、化合物67、68）。

（2）活性領域の検索

カルボキシル末端部を含むグレリン（16-28）に細胞内Ca上昇活性が比較的低い（EC₅₀ > 10,000 nM）こと、一方で、アミノ末端部を含むヒトグレリン（1-15）とラットヒトグレリン（1-15）のEC₅₀値がそれぞれ7.0 nM、8.6 nMと細胞内Ca上昇活性が保持されたことから、グレリンの活性部位はアミノ末端部分に存在することが明らかとなった（第7表）。

第7表

10

グレリン誘導体の活性4

化合物構造	Ca上昇活性 EC ₅₀ (nM)
19. Ghrelin(16-28) H-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-pro-Ala-lysLeu-Gln-Pro-Arg-OH	>10,000
20. hGhrelin(1-15) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-OH	7.0
21. rGhrelin(1-15) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-OH	8.6
22. [des Gln¹⁴]-rGhrerin GSS(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQKAQ_RKESKKPPAKLQPR	1.5

15

また、グレリン（1-15）において、ヒト型とラット型の活性がほぼ同等であることから、11位と12位のアミノ酸残基（ヒトではアルギニルーバリル、ラットではリジルーアラニル）はこれらのアミノ酸に限られない。

このようなヒトグレリン、あるいはラットグレリンで得られた構造活性相関の結果は、それぞれラットグレリンあるいはヒトグレリンに適用できる。

また、14位のグルタミンを除去した[デス-グルタミン¹⁴]-ラットグレリンに、ラットグレリンと等しいCa上昇活性($EC_{50}=1.5\text{ nM}$)が認められたことより、グレリン分子の中央部のアミノ酸が欠損していてよい。

5 (3) ペプチド鎖長とカルボキシル末端への塩基性基の導入

活性が比較的強くみられたグレリン(1-15)をもとに、適宜カルボキシル末端側アミノ酸残基を欠損させた誘導体を作成し活性を評価した。

カルボキシル末端がカルボン酸である短鎖誘導体とカルボキシル末端10がアミド化された短鎖誘導体の活性を第8表に示した。

第8表

グレリン誘導体の活性 5

化合物構造	Ca 上昇活性 EC ₅₀ (nM)
23. hGhrelin(1-11) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-OH	15
24. rGhrelin(1-11) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-OH	15
25. Ghrelin(1-10) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-OH	19
26. Ghrelin(1-9) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-OH	38
27. Ghrelin(1-8) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-OH	100
28. Ghrelin(1-8)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-NH ₂	13
29. Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	2. 6
30. Ghrelin(1-6)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-NH ₂	4. 8
31. Ghrelin(1-5) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-OH	68
32. Ghrelin(1-5)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-NH ₂	6. 2
33-1. Ghrelin(1-4) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-OH	480
33-2. Ghrelin(1-4)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-NH ₂	160
34. Ghrelin(1-3)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-NH ₂	>10,000

グレリン(1-3)アミドのCa上昇活性は比較的低かった(EC₅₀ >10,000 nM)。フェニルアラニンを延ばしたグレリン(1-4)ではEC₅₀値が480 nM、そのカルボキシル末端アミド体が160 nMとCa上昇活性

が顕著となった。

さらにロイシンアミドを付加したグレリン（1-5）アミド体の活性は、（1-4）アミド体のさらに約26倍上昇し($EC_{50}=6.2\text{ nM}$)、天然品と同レベルのCa上昇活性を示した。

5 最も強いCa上昇活性は、グレリン（1-7）アミド体においてみられ、その EC_{50} 値は2.6 nMと天然品とほぼ同等であった。

以上の結果から、グレリン活性発現のために必須な構造的要因はアミノ末端部4残基の配列に集約されるが、5位にロイシンなどの残基が付加されることで、グレリン受容体への親和性、あるいはシグナルトラン

10 スダクションが劇的に向上するため、5位にロイシンなどの残基が付加されることが好ましい。

また、上記結果から明らかなように、カルボキシル末端カルボン酸をアミド化することによりCa上昇活性が上昇する傾向がみられた。

例えば、グレリン（1-9）では、アミド化することで EC_{50} 値が38 nM

15 から5.4 nMとCa上昇活性が約7倍、グレリン（1-4）では EC_{50} 値が480 nMから160 nMとCa上昇活性が約3倍に上昇した。また、グレリン（1-9）アミドの9位塩基性残基ヒスチジン残基を除去したグレリン（1-8）アミドでは、 EC_{50} 値が5.4 nMから13 nMとなりCa上昇活性が低下し、一方で、酸性アミノ酸である8位グルタミン酸を除去し

20 たグレリン（1-7）アミドでは、逆に EC_{50} 値が13 nMから2.6 nMとなりCa上昇活性が上昇した。

アミド化の効果の一つはカルボン酸の負電荷の中和であり、上記の結果は、短鎖誘導体においてカルボキシル末端アミノ酸の塩基性が活性上昇に大きく寄与することを示すものである。

25 この結果を踏まえ、高い活性が得られたグレリン（1-7）アミドを中心に、カルボキシル末端部に塩基性を付与した誘導体を作成し、活性

を調べた。

結果を第9表に示した。

第9表

グレリン誘導体の活性 6

化合物構造	Ca 上昇活性 EC ₅₀ (nM)
35. [Lys⁸]-Ghrelin(1-8)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Lys-NH ₂	1.1
36. [Arg⁸]-Ghrelin(1-8)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Arg-NH ₂	1.1
37. [Lys⁶]-Ghrelin(1-6)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Lys-NH ₂	12
38. [Lys⁵]-Ghrelin(1-5)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Lys-NH ₂	10
39. [^DPhe⁴, Lys⁵]-Ghrelin(1-5)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)- ^D Phe-Lys-NH ₂	1,700

5

グレリン(1-5)のカルボキシル末端部にリジンを導入した[リジン⁶]-グレリン(1-6)アミドのEC₅₀値は、4.8 nMから12 nMとなり、Ca上昇活性は若干低下したが、グレリン(1-4)では、カルボキシル末端にリジンを付加することで、EC₅₀値が480 nMから10 nMとなり、10 Ca上昇活性が約50倍上昇した。また、グレリン(1-7)のカルボキシル末端部にアルギニンあるいはリジンを付加したアミド誘導体の活性は、グレリン(1-7)アミド(EC₅₀=2.6 nM)と比べ、いずれも1.1 nMと極めて強い細胞内カルシウム上昇活性を示した。

以上、ほとんどのケースにおいて、カルボキシル末端部における酸性のマスキングおよび塩基性基を導入することで、活性が上昇することが明らかになった。

(4) アミノ末端グリシンと2位セリン残基

活性が認められたグレリン(1-7)アミド(EC₅₀=2.6 nM)〔第8表化合物29〕、あるいはグレリン(1-9)アミド(EC₅₀=5.4 nM)〔第4

表 化合物 3] をもとに、アミノ末端グリシンと 2 位セリンの活性への影響を調べた。

結果を第 10 表にまとめた。

第 10 表

5 グレリン誘導体の活性 7

化合物構造	Ca 上昇活性 EC ₅₀ (nM)
40. [N-Aminopentanoyl]-Ghrelin (3-7)-amide NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	3.4
41. [N-Acetyl]-Ghrelin (1-10) CH ₃ CO-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-OH	>10,000
42. [N-Tyr]-rGhrelin YGSS(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	120
43. [N-Glycyl]-Ghrelin (3-7)-amide H-Gly-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	380
44. [Leu²]-Ghrelin (1-7)-amide H-Gly-Leu-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	42
45. [His²]-Ghrelin (1-7)-amide H-Gly-His-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	35
46. [Lys²]-Ghrelin (1-7)-amide H-Gly-Lys-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	24
47. [Gly²]-Ghrelin (1-7)-amide H-Gly-Gly-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	78

アミノ末端のアミノ基をブロックした N^α-アセチルーグレリン (1-10) の活性が比較的弱くなった。(EC₅₀>10,000 nM)。また前述したように、[N^α-オクタノイル、セリン³]-グレリン (1-9) アミド(第 1 表 化合物 6)の活性も比較的弱くなったことから (EC₅₀>10,000 nM)、アミノ末端のアミノ基がブロックされていないことが Ca 上昇活性発現において好ましい。

一方で、アミノ末端のグリシンと 2 位セリンを、2 残基長に相当する 5-アミノ-*n*ペンタン酸 (NH₂-(CH₂)₄-CO-) で置換した、N^α-アミノ

ペントノイル-グレリン（3-7）アミドのC_a上昇活性はほぼ保持されたこと（EC₅₀=3.4 nM）、および2位セリンを欠損させた[N^a-グリシル]-グレリン（3-7）アミドのC_a上昇活性が低下すること（EC₅₀=380 nM）、アミノ末端にチロシン残基を付与した[N-チロシル]-ラットグレリンのC_a上昇活性が低下すること（EC₅₀=120 nM）などから、より強い活性を得るために好ましいアミノ末端アミノ基の位置は、3位のオクタノイルセリン残基からアミノ酸残基で2残基相当分、アミノ末端方向に存在することが好ましい。

また、グレリン（1-7）アミドにおいて、2位セリンをロイシン、
10 グリシン、ヒスチジン、リジンに置換した誘導体のEC₅₀値は、それぞれ42 nM、78 nM、35 nM、24 nMとなり、グレリン（1-7）アミドと比べ、C_a上昇活性がやや低下した。

本結果から 2 位セリン残基-NH-CH(CH₂OH)-CO-がアミノペンタン酸の部分構造-CH₂-CH₂-CO-に置き換えることができることから、少なくとも
15 2 位セリン残基はグレリンアミノ末端のアミノ基を3位オクタノイル基から一定の距離を保つスペーサー的な役割を果たしている。また、5-アミノペンタン酸の置換で活性が保持されたのは、アルキルアミン構造の導入によってアミノ末端の塩基性が上昇したからである。

以上まとめると、アミノ末端部のグリシン残基はそのアミノ基をもつて、グレリン分子のアミノ末端に塩基性を与え、グレリンの活性を発現せしめていると考えられるため、アミノ末端部のアミノ基はブロックされていないことが好ましい。

また2位セリン残基はアミノ末端アミノ基を3位オクタノイル基から一定の距離を保つスペーサー的な役割を果たしていると考えられるため、
25 比較的嵩の小さい側鎖を有するアミノ酸や非アミノ酸化合物で置き換えてよい。即ち、グレリン分子においてアミノ末端アミノ基を基点に才

クタノイル基の位置が規定されており、この位置関係がグレリン活性構造の一部を形成している。

すなわち、2位アミノ酸側鎖は嵩高い構造よりは、むしろセリン、アラニン、ノルバリンのように、側鎖が比較的小さく、近隣残基の自由度5を束縛しないアミノ酸残基が好ましい。加えて、N^α-アミノペントノイルーグレリン(3-7)アミドのC_a上昇活性が、ほぼ保持された(EC₅₀=3.4 nM)ことから、2位セリンは非アミノ酸化合物に置換可能である。

(5) 3位、および4位アミノ酸残基の光学活性

10 グレリン(1-7)アミドの構造をもとに、3位セリンと4位フェニルアラニンをそれぞれL-体からD-体に変換した誘導体を作成し、3位と4位アミノ酸の光学活性の活性に及ぼす影響を検討した。具体的には、良好な活性が保持された[セリン³(オクチル)]-グレリン(1-7)アミド(EC₅₀=5.8 nM)〔第11表 化合物50〕、あるいは[システイン³(オクチル)]-グレリン(1-7)アミド(EC₅₀=7.4 nM)〔第11表 化合物48〕をもとに3位セリンと4位フェニルアラニンを、それぞれ対応するL-体、D-体に置き換えた誘導体を作成した。

結果を第11表にまとめた。該結果より、3位と4位のアミノ酸はともにL-体であることが好ましい。

第 1 表

グレリン誘導体の活性 8

化合物構造	Ca 上昇活性 EC ₅₀ (nM)
48. [Cys³(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser-Cys (C ₈ H ₁₇) -Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	7.4
49. [Cys³(Octyl), ^DPhe⁴]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser-Cys (C ₈ H ₁₇) - ^D Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	3,000
50. [Ser³(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser-Ser (C ₈ H ₁₇) -Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	5.8
51. [Ser³(Octyl), ^DPhe⁴]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser-Ser (C ₈ H ₁₇) - ^D Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	2,200
52. [^DSer³(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser- ^D Ser (C ₈ H ₁₇) -Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	>10,000
53. [^DSer³(Octyl), ^DPhe⁴]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser- ^D Ser (C ₈ H ₁₇) - ^D Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂	>10,000

(6) 3 位側鎖の結合様式

5 3 位の側鎖鎖長がグレリン鎖長 (-CH₂-0-CO-C₇H₁₅) と同じになるように、
本来のエステル結合を、逆方向のエステル（化合物番号 54）、アミド（化
合物番号 55, 56）、ジスルフィド（化合物番号 57）、メチレン（化合物番
号 58）に置換した誘導体を作成した。あわせて、β 炭素上に立体障害を
もつエステル誘導体（化合物番号 59、60）、メチレンが 3 ユニット分延び
10 た形のアミド誘導体（化合物番号 61）を作成した。結果を第 12 表にま
とめた。

第 12 表

グレリン誘導体の活性 9

化合物構造	Ca 上昇活性 EC ₅₀ (nM)
54. [Asp³(0-Heptyl)]-hGhrelin GSD(0-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	5. 1
55. [Asp³(NH-Heptyl)]-hGhrelin GSD(NH-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	11
56. [Dap³(Octanoyl)]-hGhrelin GS-NH-LCH(CH ₂ NHCO-C ₇ H ₁₅)-CO-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2. 6
57. [Cys³(S-Heptyl)]-hGhrelin GSC(S-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1. 4
58. [Adod³]-hGhrelin GS-NH-CH(n-C ₁₀ H ₂₁)-CO-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	0. 91
59. [Thr³(Octanoyl)]-hGhrelin GST(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	10
60. [Leu², Thr³(Octanoyl)]-hGhrelin GLT(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	46
61. [Lys³(Octanoyl)]-hGhrelin GSK(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	32

3 位側鎖をすべてメチレン基に置きかえた化合物 58 の活性が最も強く、EC₅₀ 値は 1 nM 以下であった。その他、結合の種類によって活性の高低は多少みられるものの、3 位アミノ酸側鎖に結合様式は活性に大きな影響を与えないことが確認された。

(7) 3 位側鎖の疎水性

3 位の Ser(Octanoyl) 基を、天然アミノ酸を中心に、疎水性アミノ酸で置換した誘導体を作成し、それらの活性を調べた。結果を第 13 表にまとめた。

第13表

グレリン誘導体の活性10

化合物構造	Ca上昇活性 EC ₅₀ (nM)
62. [Trp³]-hGhrelin GSWFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	31
63. [Phe³]-hGhrelin GSFFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2,000
64. [Cha³]-hGhrelin GS-Cha-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	19
65. [2-^LNal³]-hGhrelin GS- ^L Nal- FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	8.2
66. [2-^DNal³]-hGhrelin GS- ^D Nal- FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	>10,000
67. [Ser³(Bz1)]-hGhrelin GSS(CH ₂ -C ₆ H ₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	7.6
68. [Cys³(Trityl)]-hGhrelin GSC(C-Ph ₃)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	20
69. [Ser³(4-Methylpentanoyl)]-hGhrelin GSS(CO-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	4.4
70. [Leu³]-hGhrelin GSLFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	4,400
71. [Ile³]-hGhrelin GSIFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	>10,000
72. [Lys³]-hGhrelin GSKFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	120
73. [Nle³]-hGhrelin GS-Nle-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2,800
74. [Val³]-hGhrelin GSVFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1,600

3位にトリプトファン、シクロヘキシルアラニン、ナフチルアラニン
5のような芳香族性の疎水性アミノ酸を有する誘導体のEC₅₀値は、それ
ぞれ31 nM, 19 nM, 8.2 nMであり、Ca上昇活性は保持された。意外にも
フェニルアラニンを3位に導入すると幾分Ca上昇活性は低かったが、

疎水性を上昇させた Ser(Bzl), Cys(Trityl)を 3 位に導入しても、同様に C_a 上昇活性は保持されたことから、3 位側鎖の疎水性は活性発現により好ましいことが確認された。

一方、3 位にロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリンのような脂肪族性の疎水性アミノ酸を導入すると、芳香族性アミノ酸を導入した場合と比べ、幾分低目ではあるが、全般に C_a 上昇活性は保持された。ノルロイシンを 3 位に有する化合物 73 の活性が EC₅₀ = 2,800 nM であるのに対し、ノルロイシン側鎖にアミノ基が付加した 6-アミノ-ノルロイシン（リジン；化合物 72）の活性は EC₅₀ 値が 120 nM と上昇していることは、前述したカルボキシル基末端において塩基性であることが好ましいのと同様に、3 位側鎖においても塩基性の付与が好ましいことが確認された。

（8）短鎖グレリン誘導体

グレリンの活性はアミノ末端部 1 – 4 で顕著に発現し、5 位にロイシンを付加することで増強されること、3 位アミノ酸残基は疎水性側鎖を有するものが好適であること、塩基性残基の導入が活性を上昇させること、及び 1 位と 2 位のアミノ酸残基は δ-アミノ酸などの 2 残基相当長の非アミノ酸化合物で置換されうことなどの結果から、第 14 または 15 表の化合物番号 76 から 87 に示すように、アミノ末端部（1 – 5）配列を基本にした種々の短鎖グレリン誘導体を作成してそれらの活性を調べた。結果を第 14 または 15 表にまとめた。

なお化合物 80 は既知である (Ipamorelin ; K. Raum ら、Eur. J. of Endocrinol., 139 卷、552~561 ページ、1998 年)。

第 14 表

グレリン誘導体の活性 1 1

化合物構造	Ca 上昇活性 EC ₅₀ (nM)
75. [Lys ⁷]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Lys-NH ₂	11
76. [N-Aminopentanoyl, Ser ³ (Octyl), Lys ⁵]-Ghrelin(3-5)-amide NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Lys-NH ₂	12
77. [N-Aminopentanoyl, ^D Ser ³ (Octyl), ^D Phe ⁴ , Lys ⁵]-Ghrelin(3-5)-amide NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO- ^D Ser(C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Lys-NH ₂	1, 600
78. [Aib ¹ , His ² , Ser ³ (Octyl), Lys ⁵]-Ghrelin(1-5)-amide H-Aib-His-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Lys-NH ₂	34
79. [Aib ¹ , His ² , ^D Ser ³ (Octyl), ^D Phe ⁴ , Lys ⁵]-Ghrelin(1-5)-amide H-Aib-His- ^D Ser(C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Lys-NH ₂	38
80. [Aib ¹ , His ² , ^D Nal ³ , ^D Phe ⁴ , Lys ⁵]-Ghrelin(1-5)-amide H-Aib-His- ^D Nal- ^D Phe-Lys-NH ₂	2. 5

既知である化合物 80 の Ca 上昇活性が 2. 5 nM と高かったことから、
化合物 80 における 3 位の 2-D-ナフチルアラニンを D-オクチルセリンに
置換した化合物 79 の活性を調べたところ、EC₅₀ 値は 38 nM であり、活性
は保持された。1 位と 2 位のアミノ酸構造が異なるが、化合物 79 と同様
に D-オクチルセリンと D-フェニルアラニンを 3 位と 4 位に有する化合物
77 の活性が 1, 600 nM に低下したことを併せて考えると、1 位と 2 位に対
応するアミノ酸の配列または構造が、活性発現に重要な 3 位と 4 位のア
ミノ酸側鎖の立体配置にも影響を与えている。

即ち、1, 2 位をアミノペンタン酸に置換した場合、3 位の 2-D-ナフチ
ルアラニンと 4 位 D-フェニルアラニンを、それぞれ対応する L-アミノ酸
に置換しても活性は 34 nM に保持された（化合物 78）ことなどから、グ

レリンの 1 位と 2 位のアミノ酸配列、Gly-Ser は 3 位と 4 位に L- 立体配置を要求するが、他のアミノ酸配列、例えば、Aib-His 等の導入により 3, 4 位が D- 立体配置でも活性が顕著となる。または、1, 2 位にアミノペプチド酸を導入することで 3, 4 位は L-, D- いずれの立体配置でも活性発現がみられることが確認された。

第 15 表

グレリン誘導体の活性 1/2

化合物構造	Ca 上昇活性 EC ₅₀ (nM)
81. [N-Aminopentanoyl, Ser ³ (Octyl)]-Ghrelin(3-5)-amide NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH ₂	11
82. [N-Aminopentanoyl, Ser ³ (Octyl)]-Ghrelin(3-5)-methylamide NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-CH ₃	12
83. [N-Aminopentanoyl, Ser ³ (Octyl)]-Ghrelin(3-5)-ethylamide NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-C ₂ H ₅	22
84. [N-Aminopentanoyl, Ser ³ (Octyl)]-Ghrelin(3-5)-benzylamide NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-C ₆ H ₅	98
85. [N-Aminopentanoyl, Ser ³ (Octyl)]-Ghrelin(3-5)-aminoethylamide NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂	3.5
86. [N-Aminopentanoyl, Ser ³ (Octyl), MePhe ⁴ , MeLeu ⁵]-Ghrelin(3-5)-amide NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-MePhe-MeLeu-NH ₂	82
87. [^D Leu ⁵]-hGhrelin GSS(CO-C ₇ H ₁₅)F- ^D L-SPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	220

グレリンのアミノ末端部 (1-5) 配列を基本にした
10 [N-Aminopentanoyl, Ser³(Octyl)]-Ghrelin(3-5)を用い、カルボキシル

基末端部の構造活性相関を調べた。5位ロイシンのカルボキシル基末端をアミド、メチルアミド、エチルアミド、ベンジルアミドで修飾したところ、活性は保持されたが、EC₅₀の値がそれぞれ、11 nM, 12 nM, 22 nM, 98 nM と次第に低下する傾向が見られた。一方、エチルアミドをアミノ 5 エチルアミドとすることで、EC₅₀が 3.5 nM と活性は上昇したことより、グレリン分子においてカルボキシル基末端部に塩基性を付与することが好ましいことがわかった。

これら種々のカルボキシル末端アミド誘導体は、生体内でカルボキシペプチダーゼ類による酵素分解に抵抗することからも有用な化合物である。同様に、N-メチルアミノ酸を含む化合物 86 (EC₅₀=86 nM) も酵素 10 抵抗性を有する点で有用な化合物である。

実施例 1 2 ラットにおけるグレリン誘導体の GH 放出活性

(1) ラットにおける各種長鎖グレリン誘導体の GH 放出活性

15 ネンブタール麻酔下の IGS-SD 系ラット（約 7 週齢）に化合物 17；[Ser³(Octyl)]-hGhrelin を 18 nmol/kg、化合物 18；[Cys³(Octyl)]-rGhrelin を 30 nmol/kg、化合物 65；[2-¹Na³]-hGhrelin を 100 nmol/kg、あるいは化合物 15；[Ser³(3-Phenylpropinyl)]-hGhrelin を 18 nmol/kg を急速静脈内投与した（各 n=3）。投与 15 分後に血漿を採取 20 し、GH 濃度をラジオイムノアッセイ法（Biotrak/Amersham 社）にて測定した。コントロールとして、0.2%ウシ血清アルブミン（BSA）-生理食塩液、とそれぞれ 6 nmol/kg の rGhrelin、hGhrelin、80 nmol/kg の Ipamorelin（化合物 80）を投与し、投与後 15 分の血漿中 GH 濃度を比較した（各 n=3）。

結果を第 1 3 表に示した。化合物 17；[Ser³(Octyl)]-hGhrelin、化合物 25 18；[Cys³(Octyl)]-rGhrelin および化合物 15；[Ser³(3-PhPr)]-hGhrelin はいずれも強い GH 放出活性を示し、

[2-¹Na]³-hGhrelin の GH 放出活性も細胞内 Ca 上昇活性と良い相関が見られた。

第 16 表

各種長鎖グレリン誘導体の GH 放出活性

投与化合物	EC ₅₀ 値 (nM)	投与量 (nmol/kg)	投与 15 分後の血漿中 GH 濃度 (ng/mL)			
			個体 1	個体 2	個体 3	平均土標準偏差
生理食塩液	—	—	32	52	59	49 ±12
hGhrelin	1.3	6	1802	1613	2203	1873 ±301
rGhrelin	1.5	6	2056	1082	1205	1448 ±530
Ipamorelin(化合物 80)	2.5	80	377	260	1184	607 ±503
[Ser ³ (Octyl)]-hGhrelin	1.2	18	1626	1602	1743	1657 ±75
[Cys ³ (Octyl)]-rGhrelin	5.4	30	2786	2342	2354	2494 ±253
[Ser ³ (Phenylpropionyl)]-hGhrelin	1.4	18	2119	2078	1581	1926 ±299
[2- ¹ Na] ³ -hGhrelin	8.2	100	1637	1576	1357	1524 ±147

5

(2) [Cys³(Octyl)]-rat Ghrein 投与による血漿中 GH 濃度推移
ネンブタール麻酔下の Wistar 系ラット雄(約 260~280 g)に、化合物 18 ; [Cys(Octyl)]-rat Ghrelin を 5 μg/head 静脈内投与したときの、血中に放出される GH を測定した。コントロールとして生理食塩水、および rat 10 Ghrelin (5 μg/head) を投与し、本品と比較した。

第 17~19 表に示すように、[Cys³(Octyl)]-rat Ghrein の GH 分泌促進活性は、分泌された GH の Cmax が天然型ラットグレリンと同等(ともに約 1,100 ng/ml) であり、さらに分泌時間を延長させる傾向を示した。本

品の細胞内 Ca 上昇活性は EC₅₀ 値で 5.4 nM であった。

第 17 表

[Cys³(Octyl)]-rat Ghrein 投与による血漿中 GH 濃度推移

[Cys(C18) ³]-ラットグレイン 5 μg/head	時間 (分)							
	0	5	10	15	20	30	60	
血漿中 GH 濃度 (ng/mL)	個体 1	377	338	687	927	900	469	98
	個体 2	101	294	258	300	358	245	86
	個体 3	59	476	949	1229	1417	704	133
	個体 4	33	530	959	1451	1299	800	220
	個体 5	32	613	1060	1561	1359	726	122
平均		120	450	783	1093	1067	589	132
土標準偏差		±146	±133	±324	±506	±445	±229	±53

5 第 18 表

生理食塩液投与による血漿中 GH 濃度推移

生理食塩液	時間 (分)							
	0	5	10	15	20	30	60	
血漿中 GH 濃度 (ng/mL)	個体 1	0	88	129	133	116	107	430
	個体 2	204	122	118	134	128	69	36
	個体 3	77	0	0	0	0	0	11
	個体 4	0	0	0	0	48	27	110
	個体 5	0	0	0	0	0	0	210
平均		56	42	49	53	58	41	159
土標準偏差		±89	±58	±67	±73	±61	±47	±170

第19表

ラットグレリン投与による血漿中 GH 濃度推移

ラットグレリン 5 μg/head		時間 (分)						
		0	5	10	15	20	30	60
血漿中 GH 濃 度 (ng/mL)	個体 1	143	186	425	405	215	56	3
	個体 2	10	1396	2028	1566	876	242	27
	個体 3	838	163	443	681	419	120	36
	個体 4	348	556	1387	1469	1293	663	100
	個体 5	0	875	1380	1009	1414	452	20
平均		268	635	1133	1026	843	306	37
土標準偏差		±348	±517	±690	±498	±525	±250	±37

実施例 13 グレリンの食欲増進作用

5 (1) 脳室内投与による食欲増進作用

各種濃度のラットグレリンを溶解した生理食塩水を、体重が 300 g から 325 g の雄ウィスター (Wistar) 系ラット (一群は 16 から 20 頭) に、朝 8 時 45 分に脳室内投与した。対照は、グレリンを含まない生理食塩水を脳室内投与した。投与後は自由に摂餌させ、投与後 2 時間の摂餌量を測定した。第 6 図に示すように、50 pmol の脳室内投与で摂餌量の増加が認められ、200 pmol および 500 pmol では投与量依存的に摂餌量の増加が認められたが、2 nmol の投与では摂餌量の増加は低下した。通常ラットは夜間に摂餌するから、朝は満腹で殆ど摂餌しないが (第 6 図で対照とした生理食塩水を参照)、グレリンの脳室内投与によって食餌量が増加したことは、グレリンに食欲増進作用があることを示している。

10 (2) 静脈内投与による食欲増進作用

9 ヶ月齢、雌の SD (Sprague-Dawley) 系ラット (5 頭) および ウィスター 系ラット (4 頭) に、ラットグレリン 50 μg/kg を尾静脈内投与し、投与後 2 時間の摂餌量を測定した (夕方 16:00 ~ 19:00 に評価)。

15 20 第 20 表に示したように、別の日の同時刻、同一個体について調べたラ

ットグレリン非投与時の摂餌量に比べて、グレリンの静脈内投与によって、摂餌量が明らかに増加した。すなわち、グレリンの静脈内投与によっても、食欲増進作用があることが示された。

第20表

5

		食餌量 (g)	
系 統	個体番号	グレリン投与	グレリン非投与
S-D	1	3.2	2.2
	2	3.7	1.0
	3	3.2	0.1
	4	2.7	1.3
	5	2.6	0.8
	平均値	3.1	1.1
ウィスター	標準偏差	0.4	0.8
	6	2.3	0.2
	7	1.9	1.4
	8	1.6	0.1
	9	2.1	0.3
	平均値	2.0	0.5
	標準偏差	0.3	0.6

実施例14. グレリンによる胃機能の亢進

グレリン投与による、胃機能への効果を調べるために以下のような実験を行った。雄性の SD 系ラット（体重 200~280g、7~8 週齢）を実験

10 の 20 時間以上前から絶食して用いた。ラットはウレタン（1.25 g/kg）の腹腔内投与により麻酔し、加温パッドおよび加温ライトを用いて保温した。気管内カニューレを挿管し、さらに食道を絹糸にて結紮して、下記の胃酸分泌あるいは胃運動測定用の手術を施した。覚醒下の実験は、エーテル吸入による軽度麻酔下に下記の胃酸分泌あるいは胃運動測定用の手術を施した。

ウレタン麻酔下での胃酸分泌の実験は、Ohno らの方法 [Ohno, T., et

al., *Jpn. J. Pharmacol.* 43, 429-439 (1987)] に従って手術を行った。つまり、仰臥位に腹部を正中切開し、胃および十二指腸を露出させた。ポリエチレンチューブを前胃部から挿管し急性胃瘻を作製した。もう 1 本のポリエチレンチューブを十二指腸部の切開により胃内に挿入し、5 幽門部周囲を結紮して固定した。胃内をリザーバー内で pH 7.0 に調整し、37°C に加温した生理食塩水で灌流した。流速は 1.0 ml/min とした。pH 固定装置 (Hiranuma, Comitite-8) と 100 mM の NaOH 液を用いて灌流液が pH7.0 になるように滴定した。基礎胃酸分泌量が安定していることを確認した後、被験薬を静脈内投与し、胃酸分泌速度を 5 分間隔で測定した。

10 各群 4 例の動物を用いた。

覚醒下の実験では、エーテル吸入による軽度麻酔下に同様の手術を施した後に、側腹部に小切開を加えて灌流用チューブを体外に導出した。露出した胃および十二指腸を腹腔内に収め、切開部を縫合し、ポールマン型のラット用固定ケージ内に動物を伏臥位に拘束し、麻酔から覚醒したことを確認して実験に供した。なお、食道を結紮したが、気管カニューレは挿入しなかった。

ウレタン麻酔下での胃運動測定実験は、Takeuchi & Nobuhara の方法 [Takeuchi, K. and Nobuhara, Y., *Digestive Diseases and Sciences* 30, 1181-1188 (1985)] に従って、ミニチュアバルーン法を用いた。すなわち、水を充填したバルーンと支持用カテーテルを前胃部切開にて胃の中に挿入した。胃の腺部分に横たわるように固定し、カテーテルの一端を圧トランス・デューサー (日本光電株式会社製、LPU-0.1-350-0-II) に接続した。胃運動が安定していることを確認した後、被験薬を 60 分間隔で累積的に静脈内投与した。胃運動は 20 cmH₂O 以上の振幅を持つ収縮運動の胃内圧振幅と収縮反応数を 10 分間隔で測定した。各群 4 例の動物を用いた。覚醒下の実験では、エーテル吸入による軽度麻酔下に同様の

手術を施した後に切開部を縫合し、ボールマン型のラット用固定ケージ内に動物を伏臥位に拘束し、麻酔から覚醒したことを確認して実験に供した。

ラットグレリンおよびヒスタミン₂塩酸塩は生理食塩水に溶解し、尾静脈内に 1 ml/kg の容量で投与した。グレリンの作用に迷走神経活動が関与するか否かを調べるために、グレリンの投与 30 分前に硫酸アトロピンを皮下投与するか、あるいは頸部迷走神経束を両側性に切断した。さらにグレリンの作用におけるヒスタミン H₂受容体の関与を調べるためには、グレリンの投与 30 分前にファモチジン（ガスター[®]、山之内製薬株式会社製）を皮下投与した。結果は平均値±標準誤差値で表した。統計学的解析は Dunnett の多重比較法を用いて行った。P 値<0.05 を統計学的有意と判定した。

第 7 A 図および第 21 表に示すように、ウレタン麻酔下においてラットグレリンを 0.8~20 μg/kg の用量で静脈内投与すると、用量依存的に胃酸分泌が促進した。

麻酔下では、グレリン投与前には胃の自発運動はほとんど認められない。その状態でラットグレリンを 0.8~20 μg/kg の用量で静脈内投与すると、第 8 A、B 図および第 21 表に示すように、胃運動の振幅及び頻度ともに亢進した。これらの反応はラットグレリンの投与後、速やかに認められた。20 μg/kg の投与時は、胃酸分泌は増大し、20 分以内に最大値に達した後、投与後 90 分までには徐々に減衰した。ラットグレリンの 20 μg/kg による胃酸分泌促進作用の最大反応の大きさは、第 7 A、B 図に示すように、ヒスタミン 3 mg/kg を静脈内投与したときに惹起される反応にほぼ匹敵するものであった。胃運動の振幅に対する亢進作用は、各用量とも 10 分以内に最大反応に達し、20 μg/kg 投与時は 50 分後までに徐々に減衰した。

さらに、第21表に示すように、ラットグレリンの $20\text{ }\mu\text{g/kg}$ 投与で惹起される胃酸分泌促進作用はアトロピンあるいは両側頸部迷走神経切除術の前処置によってほぼ完全に抑制され、ヒスタミン H_2 受容体拮抗薬であるファモチジンを 1 mg/kg 皮下投与する前処置では全く影響されなかつた。また、ラットグレリン投与で惹起される胃運動亢進作用もアトロピンあるいは両側頸部迷走神経切除術の前処置によって完全に抑制された。このことから、グレリンの胃機能亢進作用は、ヒスタミン系機序によるものではなく、迷走神経系を活性化することによるものであることが確認された。

一方、覚醒下ラットにおいても、上記ウレタン麻酔下と同様に、ラットグレリン（4および $20\text{ }\mu\text{g/kg}$ ）を静脈内投与すると胃酸分泌が促進した。また、覚醒下ラットでは麻酔下に比べて被験薬投与前から胃の自発運動が発生しており、その状態にラットグレリンを $0.8\sim20\text{ }\mu\text{g/kg}$ の用量で静脈内投与しても、胃運動は振幅および頻度ともに亢進した。以上の結果から、ウレタン麻酔下及び覚醒下のいずれにおいても、グレリンの静脈内投与によって胃酸分泌の促進および胃運動の亢進が起こることが確かめられた。

第21表

処置		胃酸分泌 (μ 当量 /60分)	胃運動	
			頻度 (回/60分)	振幅 (cmH ₂ O/回 /60分)
生理食塩水		17.6±1.2	1.3±1.0	1.7±1.0
ラット グレリン	0.8 μ g/kg 静注	24.5±2.2	35.5±18.1	6.7±4.4
	4 μ g/kg 静注	23.5±2.6	60.8±25.6	11.1±5.3
	20 μ g/kg 静注	43.3±4.6 (*1)	100.5±20.4 (*1)	21.8±2.5 (*1)
ラット グレリン 20 μ g/kg 静注	+アトロピン 1 mg/kg 皮下投与	26.1±3.9 (*2)	0 (*3)	0 (*3)
	+迷走神経 切除術	18.4±3.7 (*3)	0 (*3)	0 (*3)
	+ファモチジン 1 mg/kg 皮下投与	43.0±4.2	NT	NT

表中の記号は、以下を示す。

* 1 p < 0.01 * 2 p < 0.05 * 3 p < 0.01

5 NT 未試験

実施例15. グレリンおよびグレリン誘導体の細胞増殖促進作用

グレリン投与による細胞増殖促進作用を調べるために以下の実験を行った。ラットグレリンあるいはチオエーテル型ラットグレリン（化合物10 18 [Cys³ (octyl)]-hGhrelin) 20 μ g/kg を ウィスター系雄性ラット（7.5 週齢）の尾静脈内に投与した。投与 17 時間後に ³H-チミジン（³H-thymidine）を尾静脈内投与し、その 1 時間後に十二指腸、空腸および骨髄を摘出した。これら組織中の DNA 画分への ³H-チミジンの 取込み量を測定し、グレリンおよびグレリン誘導体の細胞増殖促進作用を

調べた。組織を細切後にポリトロンホモジエナイザーでホモジエネートし、その遠心上清をトリクロロ酢酸で沈澱させ、DNA画分を取得した。DNA画分の放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

第22表に示すように、ラットグレリンあるいはチオエーテル型ラットグレリンの静脈内投与により、これらの組織中あるいは臓器中のDNAへの³H-チミジン取込みが促進したことから、グレリンは十二指腸、空腸および骨髄での細胞増殖促進作用を示すことが確認された。

グレリン静脈内投与後の細胞増殖促進作用のタイムコースは、GHRH(成長ホルモン放出ホルモン)投与によるものと同様であり、グレリンの細胞増殖促進作用は主に下垂体から分泌されるGH(成長ホルモン)を介するものと考えられた。GH分泌調節を生理的な因子であるグレリンに担わせることは生体調節にとって無理がなく、GHで問題となっている副作用も少ないと考えられた。

第22表

	比較例	ラットグレリン	チオエーテル型 グレリン
骨髄 (組織中)	100.0 ±17.8%	141.7 ±30.1%	144.5 ±16.5%
十二指腸 (DNA分画中)	100.0 ±14.2%	136.0 ±17.8%	114.0 ±11.7%
空腸 (DNA分画中)	100.0 ±6.8%	159.0 ±7.5%	151.0 ±23.6%

数値は比較例(生理食塩水投与群)の3例の平均値を基準とした時の放射能の取り込み量の比率(%)で示した。

実施例16 抗グレリン抗体によるグレリンの定量

ラットグレリンのアミノ末端側およびカルボキシル末端側のペプチドを抗原として作成された抗体を用い、ラジオイムノアッセイ(RIA)によって各種生体組織中のグレリンを定量した。

[C-Cys]-ラットグレリン[1-11]（ラットグレリンのアミノ末端側の 1 から 11 番目までのアミノ酸配列を有するペプチドのカルボキシル末端にシステインが結合したペプチド）および[C-Cys]-ラットグレリン[13-28]（ラットグレリンのアミノ末端側の 13 から 28 番目までのアミノ酸配列を有するペプチドのカルボキシル末端にシステインが結合したペプチド）を抗原として、ウサギを免役して N 端側抗体（抗[C-Cys]-ラットグレリン[1-11]抗体）と C 端側抗体（抗[C-Cys]-ラットグレリン[13-28]抗体）を作成した。

第 9 a 図に示すように、放射能標識したラットグレリンと N 端側抗体の結合において、ラットグレリンの IC50（半阻害量）は、反応液あたり 3.1 fmol であった。この N 端側抗体は、化学合成したヒトグレリンおよびラットグレリンと 100% 交差反応性を示したが、3 位のセリンが n-ヘキサノイル基で修飾された n-ヘキサノイル・ラットグレリンおよび 3 位のセリンが n-デカノイルで修飾された n-デカノイル・ラットグレリンとは、各々、0.3% および 2.0% しか交差反応性を示さなかった。また、N 端側抗体は脂肪酸を脱離したグレリンとは全く反応しなかった。

ラットグレリン（28 アミノ酸）、ヒトグレリン（28 アミノ酸）およびヒトやラットなどから見出されたグレリン-27（27 アミノ酸からなるグレリン）に対して、N 端側抗体は同等の親和性を示した。従って、N 端側抗体は 3 位セリンが n-オクタノイル基で修飾された天然型グレリンを特異的に認識することが確認された。

第 9 b 図に示すように、放射能標識したラットグレリンの C 端側抗体に対する結合において、n-オクタノイル基で修飾された天然型ラットグレリンおよび n-オクタノイル基が脱離したラットグレリンの IC50 は、反応液あたり 44 fmol で同等であった。すなわち、脂肪酸修飾されたグレリンにも脂肪酸が脱離したグレリンにも同等の親和性を示すことが確

認された。

以上の結果を基に、生体内各組織に存在するグレリンについて、N端側抗体によって3位セリンがn-オクタノイル基で修飾されたグレリンを定量し、C端側抗体によって脂肪酸修飾されたグレリンおよび脂肪酸が脱離したグレリンの両方を定量することができる判った。

第23表は、実際に生体各組織の脂肪酸修飾されたグレリンの含量、および脂肪酸修飾されたグレリンと脂肪酸が脱離したグレリン両方の含量を調べた結果である。

第23表

組織名	抗体と反応したラットグレリンの量 (fmol/mg組織)	
	C-RIA	N-RIA
視床下部	1.8±0.3	<0.05
下垂体	8.5±3.1	<0.05
甲状腺	3.5±2.0	<0.05
下頸腺	8.8±1.3	<0.05
胸腺	3.5±0.4	<0.05
副腎	3.1±0.4	<0.05
心房	2.3±0.2	0.07±0.01
心室	2.1±0.1	<0.05
大動脈	2.4±0.7	0.14±0.03
肺	3.1±0.4	<0.05
肝臓	2.8±0.5	<0.05
すい臓	2.6±0.6	0.15±0.05
胃	1779.8±533.9	377.31±55.83
十二指腸	106.7±7.3	20.57±0.69
空腸	60.2±17.2	10.73±5.44
回腸	20.5±5.1	0.16±0.08
盲腸	15.1±2.5	1.70±5.44
結腸	10.4±0.7	<0.05
腎臓	5.4±0.3	<0.05
精巣	2.8±0.2	<0.05
血漿 (1mL)	219.6±71.8	4.02±1.91

る定量結果を表し、N-R I Aは、N端側抗体を用いたラジオイムノアッセイ法による定量結果を表す。

また、表中の数値は、「値±標準偏差」を表す。

5 実施例 1 7 半合成法による ratGhrelin(1-28)の製造

合成スキーム

rGhrelin(6-28)と Ghrelin(1-7)を、それぞれ遺伝子工学的手法と化学合成法によって調製し、両 Ghrelin 断片から rGhrelin を製造した例を示す。

10 具体的には、 β -galactosidase97S と rGhrelin(6-28)の間に V8 プロテアーゼと KexII プロテアーゼの切断部位を有するアミノ酸配列（-QFE-SRHRR-）を有する融合蛋白質、 β -galactosidase97S-(QFE-SRHRR)-rGhrelin(6-28)を大腸菌で発現させた。本融合タンパク質を V8 プロテアーゼ処理し、SRHRR-rGhrelin(6-28)を切り出した。次に、SRHRR-rGhrelin(6-28)の全アミノ基を Boc 基で保護した後、KexII プロテアーゼ処理し、新たに 6 位 Ser のアミノ末端アミノ基が遊離した [Lys(Boc)^{11, 16, 19, 20, 24}]-rGhrelin(6-28)を得た。本保護断片と化学合成法で得られた [N^{α} -Boc]-rGhrelin(1-5)-OSu とをフラグメント縮合し、得られた [Lys(Boc)^{11, 16, 19, 20, 24}]-rGhrelin を酸処理することで rGhrelin を製造した。

本実施例では rGhrelin の半合成例を示したが、ヒト型も本方法で合成できる。

また、本実施例ではフラグメント縮合を (1-5) と (6-28) で実施したが、例えば化学合成したアミノ末部断片 (1-2), (1-3)、あるいは (1-7) と、それぞれ 28 位から 3 位までの随意の長さを有する Ghrelin のカルボキシル末部断片との融合蛋白質を遺伝子工学的に作成したカルボ

キシリ末部断片（3-28）、（4-28）、あるいは（8-28）との縮合などが可能である。化学合成の工数を軽減する場合、（1-2）と（3-28）あるいは（1-3）と（4-28）での縮合が有利である。また、縮合によるラセミ化を完全に防止する観点からは7位Proを利用した（1-7）と（8-28）の縮合が特に好ましい。

発現ベクターpG97s rGRの構築とGhrelin(6-28)融合蛋白質の発現

rat GhrelinのcDNA遺伝子配列に基づき、アミノ酸配列QFE-SRHRRをプレプロ領域に持つrGhrelin(6-28)のDNA断片を、全合成オリゴマーを用いてアニーリング法により得た。

このDNA断片をpG97SnPPH34(特開平9-296000)に挿入するため、まずpG97SnPPH34をSalIおよびSmaI処理により、ヒト副甲状腺ホルモン前駆体遺伝子を欠失させた。このものをアルカリホスファターゼ処理後、先にSalI処理、kinase処理を施したrGhrelin誘導体遺伝子断片とT4リガーゼにより連結させた。連結したプラスミドを大腸菌DH5 α 株に形質転換し、プラスミドpG97s rGRを得た。

得られたpG97s rGRを大腸菌M25(*ompT*)株に形質転換を行い、得られた形質転換株を200mlのTerrific Broth液体培地(1.2%トリプトン、2.4%酵母エキス、0.4%グルコース)3本に接種し、37℃で振盪培養した。菌体濃度がOD₆₆₀=0.8になった時点でイソプロピル1-チオ- β -D-ガラクトピラノシド(IPTG)を最終濃度2mMになるように添加し、rGhrelin(6-28)融合蛋白質を発現させた。さらに4時間培養後、遠心分離し、菌体を回収した。ラットGhrelin(6-28)融合蛋白質の構成を以下に示す。

ラットGhrelin6-28融合蛋白質：(β-galactosidase-97S)-QFE-SRHRR-rGhrelin(6-28)

rGhrelin6-28 融合蛋白質のプロセッシングと
[SRHRR]-rGhrelin(6-28)の精製

得られた菌体 20ml を TE バッファーに懸濁後、French Press にて菌体
5 破碎した。その後、3000rpm、15 分の遠心分離で封入体を回収し、10ml TE
バッファー、脱イオン水で再度懸濁し、遠心分離することで封入体を洗
10 淨した。OD₆₆₀ の値が 50.0 になるように封入体を脱イオン水で希釈し、
Tris-HCl (pH8.2) を終濃度 50mM になるように加え、尿素（終濃度 3.5M）
により封入体を溶解させた。30℃に保温した本溶液に、rV8 プロテア
15 ゼ誘導体 V8D5（以下 V8D5 と記す）（特開平 9-47291）を終濃度 10 μg/ml
になるよう添加し、30℃で 20 分酵素処理を行った。3%酢酸 (AcOH) を添
加して反応を停止させた。

切り出された [SRHRR]-rGhrelin(6-28) を含む V8D5 酵素反応停止液に
1.5 倍量の脱イオン水を加え、5N NaOH を用いて pH5.0 に調整し、β ガラ
クトシダーゼ誘導体断片を沈殿、5000rpm で 10 分間遠心分離して除去し
15 た。

[SRHRR]-rGhrelin(6-28) を含む上清を、0.1%TFA で平衡化した TSK-ODS
80Ts カラム（粒径 20μm、50 mmI.D. × 100mm、TOSOH 社製）に添加した。
バッファー A [0.8ml/min、1%アセトニトリル、0.1%TFA] 100%からバッ
20 ファー B [50%アセトニトリル、0.095%TFA] 100%の濃度勾配を 5 カラム
容量で完了するプログラムで溶出を行った。目的ペプチド
[SRHRR]-rGhrelin(6-28) を含む画分を分取した（約 50mg）。

[Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11, 16, 19, 20, 24}]-rGhrelin(6-28) の調製

約 50 mg (15 μmol) の [SRHRR]-rGhrelin(6-28) を含む 50%アセトニ
トリル水溶液に、二炭酸ジ-t-ブチルを 6 当量モル (19.2 mg, 6 × 15 μmol)
25 加え、トリエチルアミンにて pH9 に調整し、室温で 15 分放置した。反応
液に終濃度 0.5% になるように酢酸を添加し、アセトニトリルを留去した

後、0.1% TFA を含む 10% アセトニトリルで平衡化した EMPORE-Octyl(C8)HD 4mm/1ml cartridge に添加し、平衡化液で洗浄後、0.095% TFA を含む 90% アセトニトリルで [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11, 16, 19, 20, 24}]-rGhrelin(6-28)を溶出した。アセトニトリルを留去し、約 30 mg の目的物を含む溶液を 6mL 得た。

質量分析の結果、Boc 化前（測定分子量 = 3396、理論上分子量 = 3398）に比べ Boc 化後では分子量が 500 多くなつたもの（測定分子量 3395）と、600 多くなつたもの（測定分子量 = 3995）の 2 種類が主に見られた。

10 Kex2 プロテアーゼによる [Lys(Boc)^{11, 16, 19, 20, 24}]-rGhrelin(6-28) の切り出しと精製

得られた [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11, 16, 19, 20, 24}]-rGhrelin(6-28) 水溶液 (30mg, 6mL) に塩化カルシウム溶液、Tris-HCl pH8.2 をそれぞれ終濃度 0.3mM、20mM になるように添加した。Kex2 プロテアーゼ（特開平 10-229884）溶液を 1×10^5 unit/ml になるように添加後、30°C、60 分間プロテアーゼ処理した。

HPLC 上、[Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11, 16, 19, 20, 24}]-rGhrelin(6-28) のピークが消失し、[Lys(Boc)^{11, 16, 19, 20, 24}]-rGhrelin(6-28) のピークがより疎水性側に現われ、Boc-SRHRR に対応する親水性のピークが観察された。

20 原料消失を確認後、反応液を酢酸水で pH3.5 に調整し、1% 酢酸を含む 1.0% アセトニトリルで平衡化した逆相クロマトカラム ODS-80Ts (1.66cc カラム容積、粒径 20μm, TOSOH 社製) に添加した。平衡化液で 5 カラム容積で洗浄後、1% 酢酸を含む 1.0% アセトニトリルから 90.0% アセトニトリルへの濃度勾配を 5 カラム容積にて完了するプログラムを行い、25 [Lys(Boc)^{11, 16, 19, 20, 24}]-rGhrelin(6-28) を溶出させた。主画分を凍結乾燥し、目的とする保護ペプチドを 6.2mg 得た。

フラグメント縮合と脱保護

Ghrelin(1-5) (190 mg, 0.0301 mmol, 化合物31)のトリフルオロエタノール(TFE)溶液(6.00 ml)にトリエチルアミン(51.0 μ l, 0.366 mmol)、二炭酸ジ-*t*-ブチル(78.0 mg, 0.0356 mmol)のTFE溶液(4.00 ml)を加え、室温で13時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、得られた残査にエーテル(20.0 ml)を加え、[*N*^α-Boc]-rGhrelin(1-5)を180.5 mg得た。

次に、[*N*^α-Boc]-rGhrelin(1-5) (22.0 mg, 0.0301 mmol)のDMF(1.00 ml)溶液にHOSu(5.20 mg, 0.0452 mmol)を加えた後、-30℃浴中DIPCI(7.30 μ l, 0.0466 mmol)を加えた。-30℃浴で1時間、室温で18時間攪拌した後、溶媒を減圧下留去し、得られた残査をエーテルで粉末とし、[*N*^α-Boc]-rGhrelin(1-5)のサクシンイミドエステル体[N^α-Boc]-rGhrelin(1-5)-OSuを14.1 mg得た。

次に、リコンビナント法により調製した[lys(Boc)^{11, 16, 19, 20, 24}]-rGhrelin(6-28) (6.10 mg, 2.18 μ mol)のDMF(0.6 ml)溶液に、[*N*^α-Boc]-rGhrelin(1-5)-OSu(3.3 mg, 3.96 μ mol)、トリエチルアミン(2.5 μ l, 17.9 μ mol)を加え室温で24時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、得られた残査に氷冷下、直接TFA(2.00 ml)を加え、室温で1.5時間攪拌した。TFAを減圧下留去した後、残査にエーテルを加えrGhrelin(1-28)を含む粗ペプチド6.2 mgを得た。

本品を5%酢酸(AcOH)2 mlに溶かし、YMC-Pack-ODS-A(5 μ m, 20 mm x 250 mm)に添加し、0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル0%から95%までの60分間直線グラジエント(流速:10 ml/min)で溶出させた。

目的画分を分取後凍結乾燥し、更にYMC-Pack PROTEIN-RP(C4, 10 mm x 250 mm)に添加し、0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル7.5%から21.3%までの30分間直線グラジエント(流速:4.7 ml/min)で溶出させた。

目的画分を分取後、凍結乾燥し、更に YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 10 mm x 250mm)に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 7.5%から 21.3%までの30分間直線グラジエント(流速:4.7 ml/min)で溶出させた。

目的画分を分取後、凍結乾燥し、rGhrelin(1-28)を 2.1 mg 得た。

5 rGhrelin(1-28)を 2.1 mg 得た。このものは、分析用 HPLC において標準品の rGhrelin(1-28)と保持時間が一致し、細胞内カルシウム上昇活性は EC₅₀=1.5 nM と天然品と同等であった。

ESI-MS 3315.0 (理論値 3314.8), アミノ酸組成比: Ser; 3.74 (4), Glx; 5.69 (6), Gly; 1.18 (1), Ala; 2.05 (2), Leu; 2, Phe; 0.98 (1), Lys; 10 4.98 (5), His; 1.03 (1), Arg; 1.96 (2), Pro; 4.01 (4)

化合物 8 7 [^Dleu⁵]-rGhrelin(1-28)

また、[N^α-Boc]-rGhrelin(1-5)のサクシンイミドエステル化、あるいはフラグメント縮合時の副反応物として、[^Dleu⁵]-rGhrelin(1-28)が 0.8 mg 得られた。このものの細胞内カルシウム上昇活性は EC₅₀=220 nM であった。

ESI-MS 3315.0 (理論値 3314.8), アミノ酸組成比: Ser; 3.80 (4), Glx; 5.92 (6), Gly; 1.23 (1), Ala; 2.07 (2), Leu; 2, Phe; 0.97 (1), Lys; 4.92 (5), His; 1.02 (1), Arg; 1.97 (2), Pro; 4.11 (4)

D₂O/DCI 加水分解後のロイシンの GC-MS 分析: L-Leu; 1.17 (1), 20 D-Leu; 0.83 (1)

産業上の利用可能性

本発明の新ペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩は、人又は動物に投与することによって GH の分泌を誘導し、実質的な副作用を伴うことなく、小児の成長促進及び成人の GH 欠乏により代謝機能の欠損を改善する医薬として、そしてその抗体は GH 欠乏により疾病の診断にさら

には学術分野の研究ツールとして優れた作用効果を奏する。

請求の範囲

1. 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチドの少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されていることを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
5
2. (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は (b) 当該配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつ該アミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む請求の範囲第 1 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
10
3. 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22 および 23 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 2 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
15
4. 配列番号 25、26、29、30、31、32、34 および 35 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 2 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 20 5. 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドの (a) 構成アミノ酸が修飾されているか又はされていない、かつ (b) 少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換されているか又はされていないペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 25 6. 配列番号 27、28 および 33 記載のアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 又は 5 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容され

る塩。

7. (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は (b) 当該配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む請求の範囲第 5 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

8. 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22 および 23 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 7 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

9. 配列番号 25、26、29、30、31、32、34 および 35 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 7 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

10. アミノ末端の 1 番目から 4 番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が、下記の式で表される請求の範囲第 1 又は 5 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

A - B - C - D -

20 A ; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

B ; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

(ただし、A + B の分子鎖長がジペプチド相当長ある。)

25 C 又は D ; 同一であっても異なっていてもよく、(a) 修飾されたアミノ酸、(b) 疎水性側鎖を有するアミノ酸、又は (c) 塩基性側鎖を有するアミノ酸、
を表す。

11. Cが、アミノ酸の α 炭素に、(a)炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエーテル、アミドまたはジスルフィド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(b)炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸であり、Dが疎水性側鎖を有するアミノ酸であることを特徴とする請求の範囲第10項に記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

12. 配列番号2、3、9、10、11、16、17、22、25、26、27、28、29、30および31記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列において、アミノ末端の1番目から4番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が請求の範囲第10または11項に記載のペプチド系化合物であるペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

13. 修飾されたアミノ酸がアミノ末端から3番目のアミノ酸である請求の範囲第1、2、3、5、7または8項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

14. 修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシステインであることを特徴とする請求の範囲第13項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

15. アミノ酸の α 炭素に、(a)炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(b)H又は炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸を含有する請求の範囲第1、2、3、5、7または8項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

16. 修飾アミノ酸が、アミノ酸の α 炭素に、(a) 炭素数 1 以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、ジスルフィド、アミド、カルバミド又はチオカルバミド結合を介して炭素数が 1 若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、5 又は (b) 炭素数 1 以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入したアミノ酸である請求の範囲第 1、2、4、5、6、7、9、10 または 12 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

17. エステル結合により修飾された修飾アミノ酸を有する請求の範囲第 1、2、3、5、7 または 8 項記載のペプチド系化合物又はその薬10 学的に許容される塩。

18. アミノ酸の側鎖の官能基がエステル結合を形成することにより修飾された修飾アミノ酸を有する請求の範囲第 1、2、4、5、6、7、9、10、11 または 12 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

19. アミノ酸の側鎖の水酸基に脂肪酸がエステル結合したアミノ酸を有する請求の範囲第 17 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

20. 脂肪酸が、アミノ酸の側鎖の水酸基にエステル結合又はメルカプト基にチオエステル結合したアミノ酸を有する請求の範囲第 18 項記20 載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

21. 炭素数が 2 乃至 35 である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する請求の範囲第 19 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

22. 脂肪酸が炭素数 2 乃至 35 である請求の範囲第 20 項のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

23. 炭素数が 2、4、6、8、10、12、14、16 および 18

の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸が結合したアミノ酸を有する請求の範囲第 21 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

24. 脂肪酸が炭素数 2、4、6、8、10、12、14、16 および 5 18 の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸である請求の範囲第 22 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

25. 結合した脂肪酸がオクタン酸 (octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求の範囲第 23 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

10 26. 脂肪酸がオクタン酸 (octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求の範囲第 24 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

27. 結合した脂肪酸がデカン酸 (decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求の範囲第 23 項記載の 15 ペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

28. 脂肪酸がデカン酸 (decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求の範囲第 24 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

29. 請求の範囲第 1 乃至 28 項記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端に、更に塩基性アミノ酸が結合していることを特徴とするペプチド系化合物。

30. アミノ末端が炭素数 1 以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシリル基により修飾され及び／又はカルボキシル末端のカルボキシル基の OH が OZ 又は NR₂R₃ (Z は薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、R₂ 及び R₃ は H 及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示 25

す) であることを特徴とする請求の範囲第 1, 2, 3, 5, 7, 8, 13, 14, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 項記載のペプチド系化合物。

31. アミノ末端のアミノ基が、炭素数 1 以上の飽和あるいは不飽和 5 アルキル基又はアシル基の導入により修飾され及び／又はカルボキシル 末端のカルボキシル基の OH が OZ 又は NR2R3 (Z は薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基を示し、R2 及び R3 は H 及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す。) であることを特徴とする請求の範囲第 1, 10 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 29 項記載のペプチド系化合物。

32. 請求の範囲第 30 または 31 項記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端アミド誘導体に、更に塩基性基を導入したことを特徴とするペプチド系化合物。

15 33. 請求の範囲第 1 乃至 32 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物。

34. 請求の範囲第 1 乃至 32 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物。

20 35. 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、請求の範囲第 1 乃至 32 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための医薬組成物。

36. ヒト以外の動物に適用するための請求の範囲第 33 乃至 35 項 25 記載の医薬組成物。

37. 請求の範囲第 1 乃至 32 項記載のペプチド系化合物又はその薬

学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法。

3 8. 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法。
5

3 9. ヒト以外の動物に適用するための請求の範囲第 3 7 又は 3 8 項記載の治療方法。

4 0. 請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA であって、当該 DNA がコードするアミノ酸配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする塩基配列を有する当該 DNA。
10

4 1. 塩基配列が、配列番号 6、7、14、15、20、21、24、36、37、38 および 39 記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列である請求の範囲第 4 0 項記載の DNA。
15

4 2. 塩基配列が、配列番号 6、7、14、15、20、21、24、36、37、38 および 39 記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列中、アミノ酸をコードしている塩基配列である請求の範囲第 4 0 項記載の DNA。

20 4 3. 請求の範囲第 4 0 乃至 4 2 項記載の DNA を有するベクター。

4 4. 請求の範囲第 4 3 項記載のベクターを含有する細胞。

4 5. 請求の範囲第 4 0 乃至 4 2 項記載の DNA を有するベクターを有し、且つ当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されたペプチド系化合物として產生することができる細胞。
25

4 6. 請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物に対する抗

体。

4 7. 請求の範囲第 4 6 項記載の抗体を用いて請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物のアッセイ方法。

5 4 8. 請求の範囲第 4 6 項記載の抗体を用いて請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物の検出用キット。

4 9. 請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、請求の範囲第 4 0 乃至 4 2 項記載の DNA を含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物の製造方法。

15 5 0. 請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、請求の範囲第 4 0 乃至 4 2 項記載の DNA を含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物の製造方法。

5 1. 請求の範囲第 1 9 乃至 2 8 項記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、脂肪酸をアミノ酸の側鎖の水酸基にエステル結合又はメルカプト基にチオエステル結合させる活性を有する細胞を用いることを特徴とする請求の範囲第 1 9 乃至 2 8 項記載のペプチド系化合物の製造方法。

5 2. 配列番号 8 記載のアミノ酸配列中のセリンの側鎖の水酸基に脂

肪酸をエステル結合させるセリンアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする請求の範囲第19乃至28項記載のペプチド系化合物の製造方法。

53. 配列番号28記載のアミノ酸配列中のトレオニンの側鎖の水酸基に脂肪酸をエステル結合させるアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする請求の範囲第19乃至28項記載のペプチド系化合物の製造方法。

54. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物。

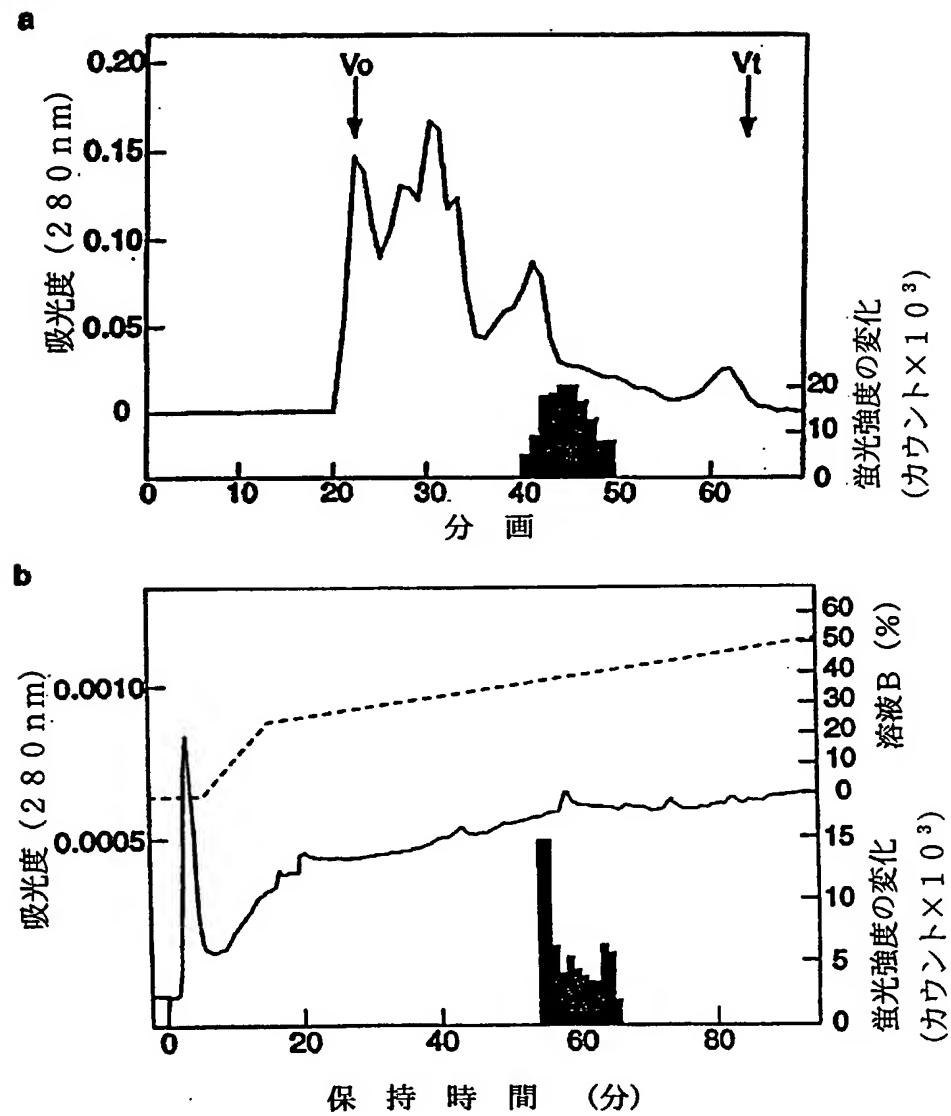
55. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法。

56. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物。

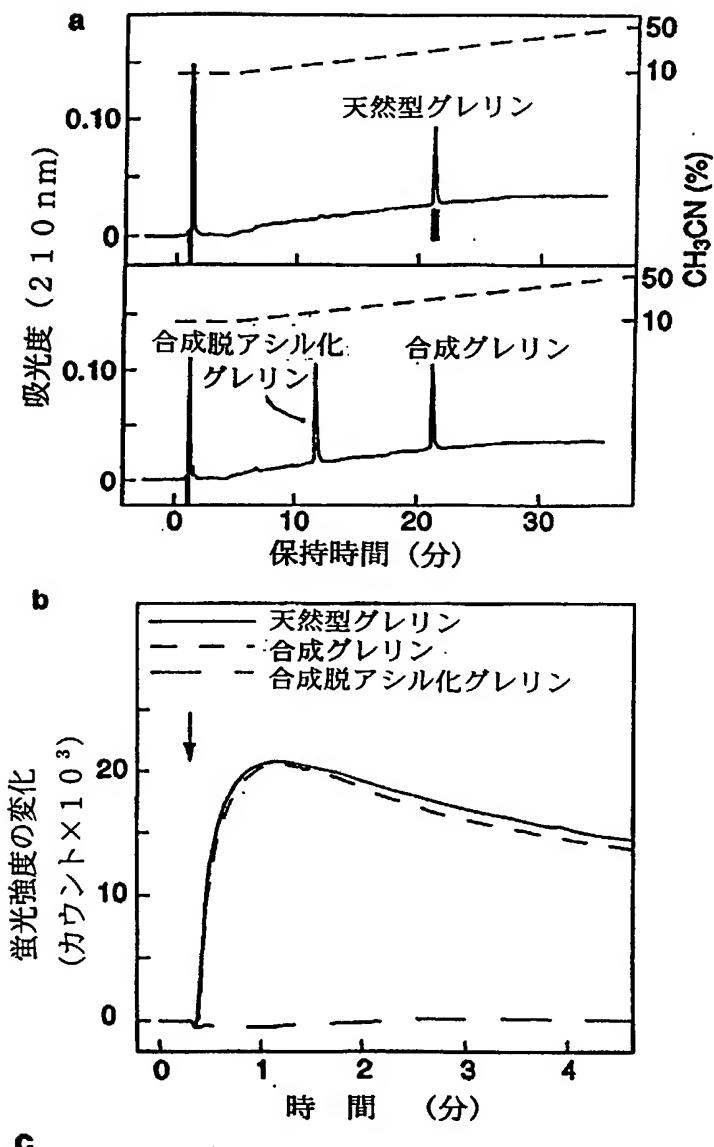
57. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして產生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法。

図 面

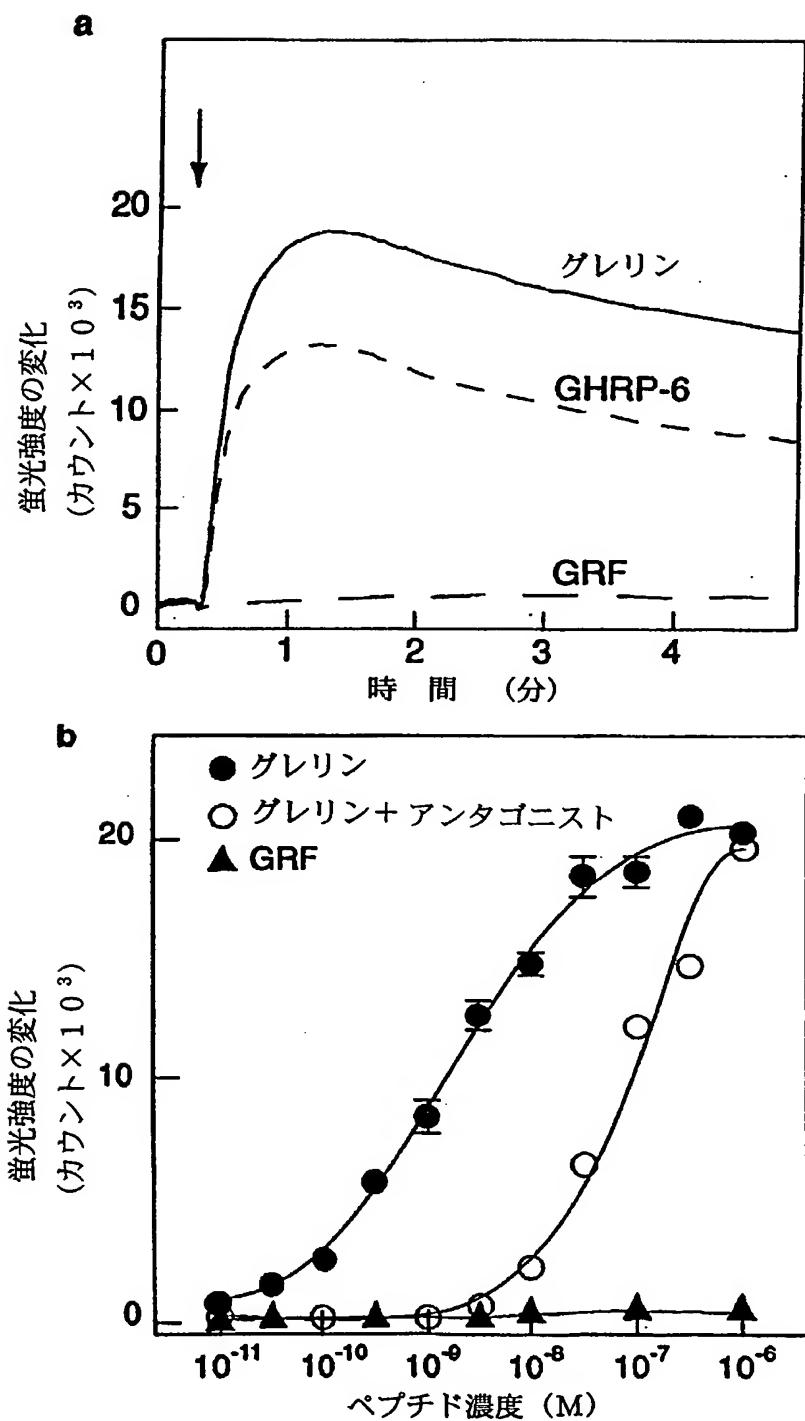
第1図



第2図



第3図

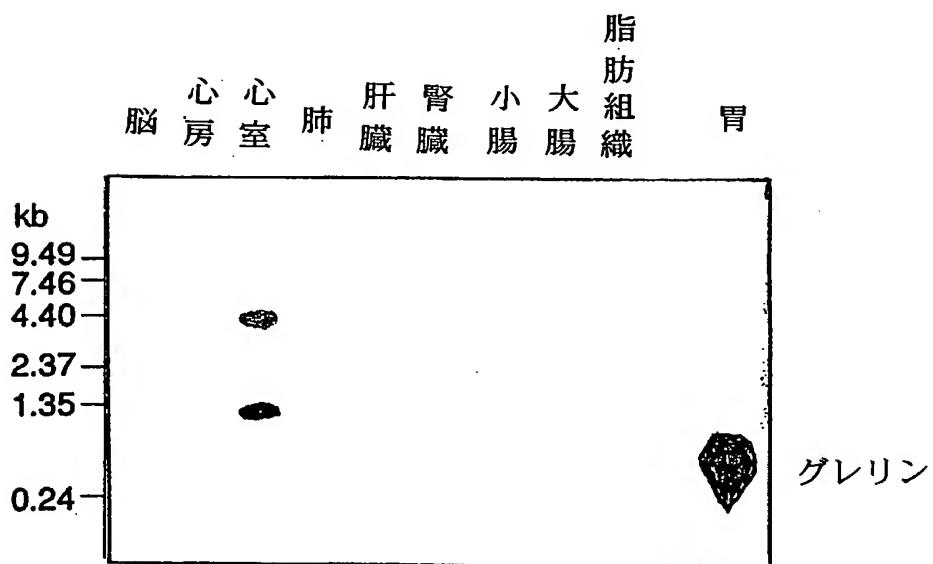


第4図

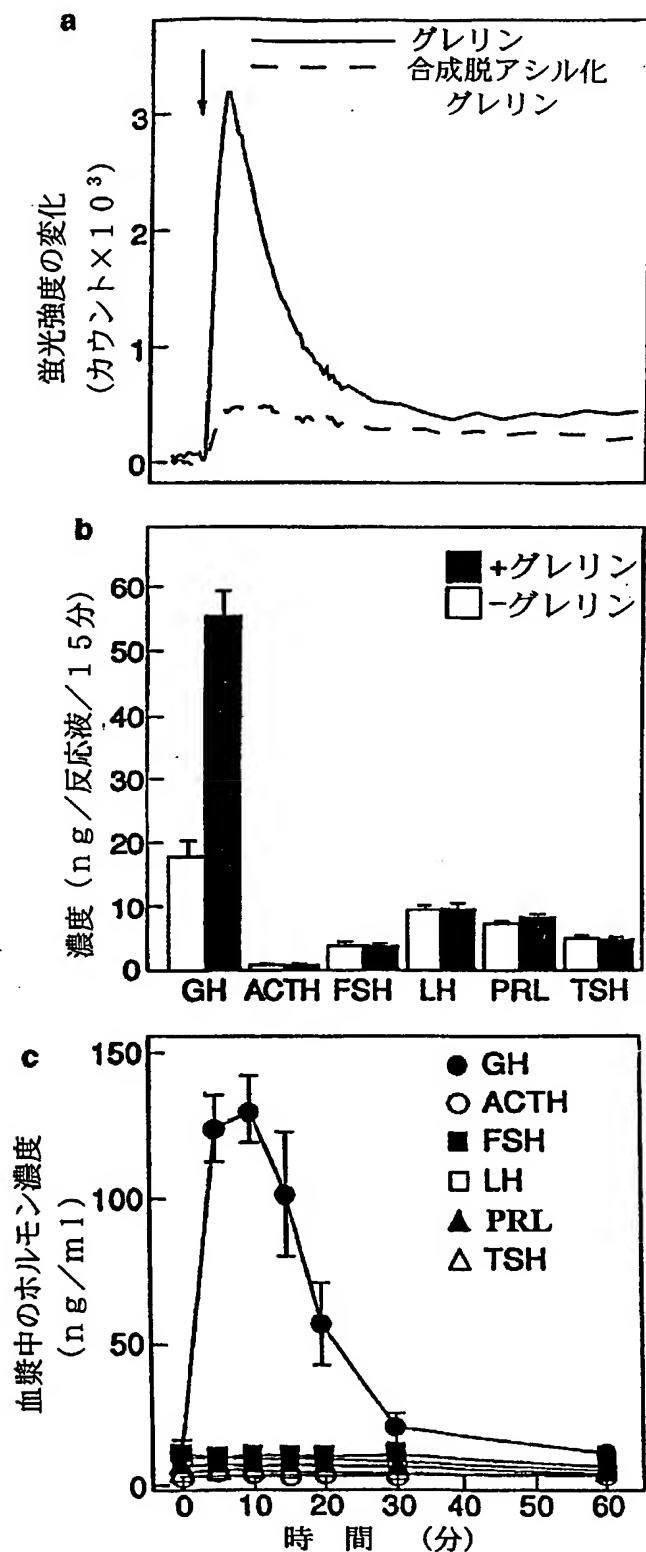
a

ヒト	1	MPSPGTVC SL LLGMLWLDLAMAGSSFLSP	30
ラット	1	<u>MVSSATIC</u> SL LL <u>LSMLWMDMAMAGSSFLSP</u>	30
		*	
ヒト	31	<u>EHQRVQ</u> QRKESKKPPAKLQPRALAGWLRLPE	60
ラット	31	<u>EHQKAQ</u> QRKESKKPPAKLQPRALEGWLHPE	60
ヒト	61	DGGQAEGAEDELE EVRFNAPFDVG IKLSCVQ	90
ラット	61	DRGQAEEAEEELE IRFNAPFDVG IKLSCAQ	90
ヒト	91	YQQHSQALGKF LQDILWEE AKEAPADK	117
ラット	91	YQQHGRALGKF LQDILWEEV KEAPANK	117

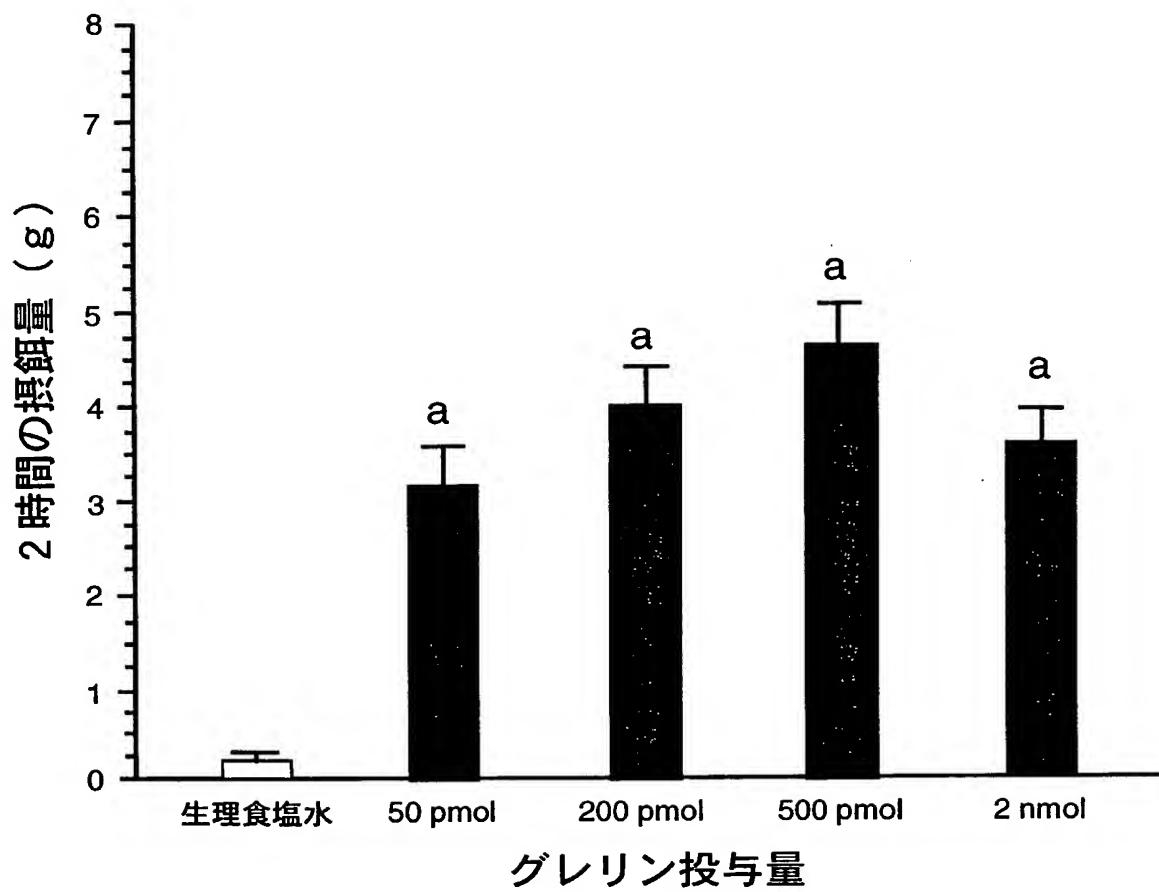
b



第5図

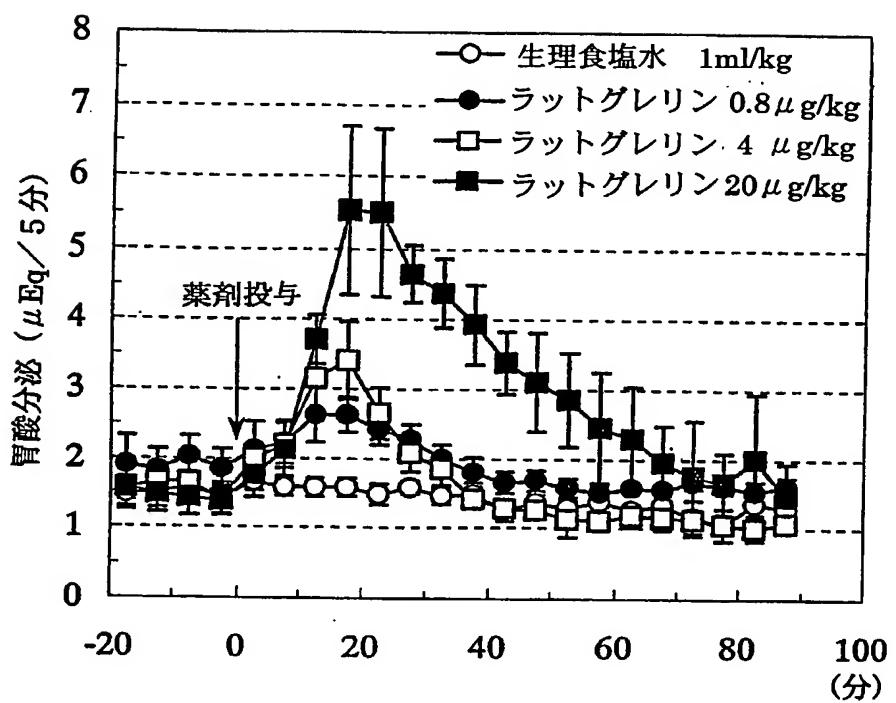


第 6 図

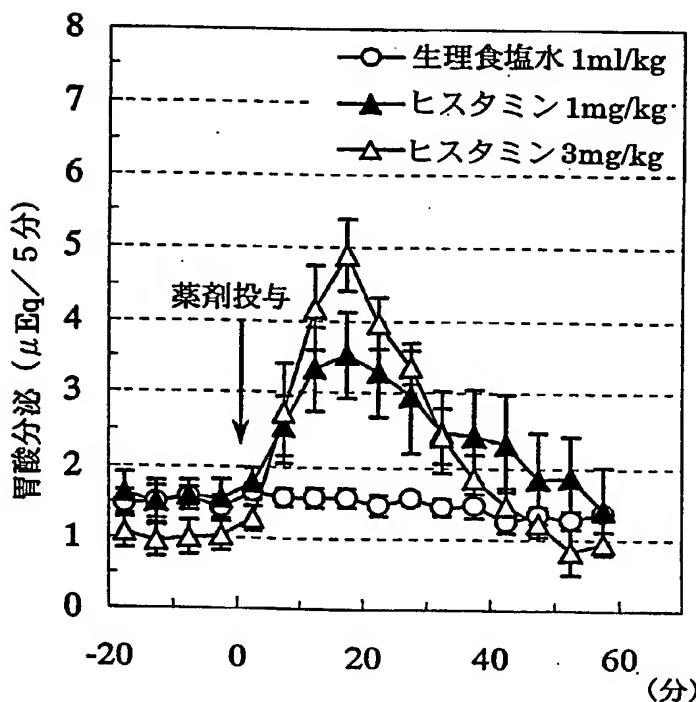


第7図

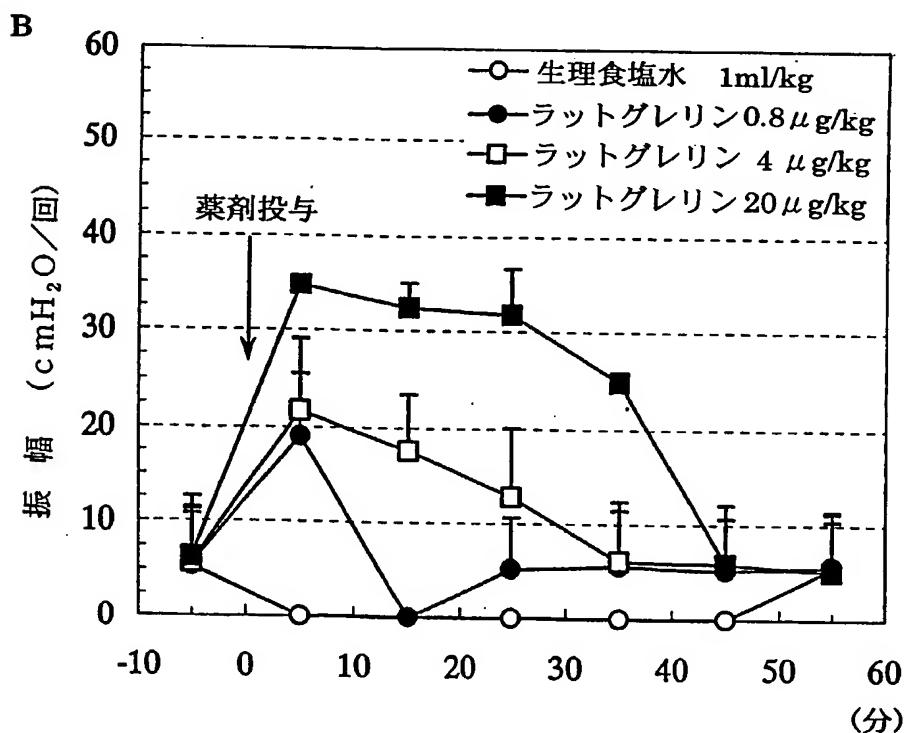
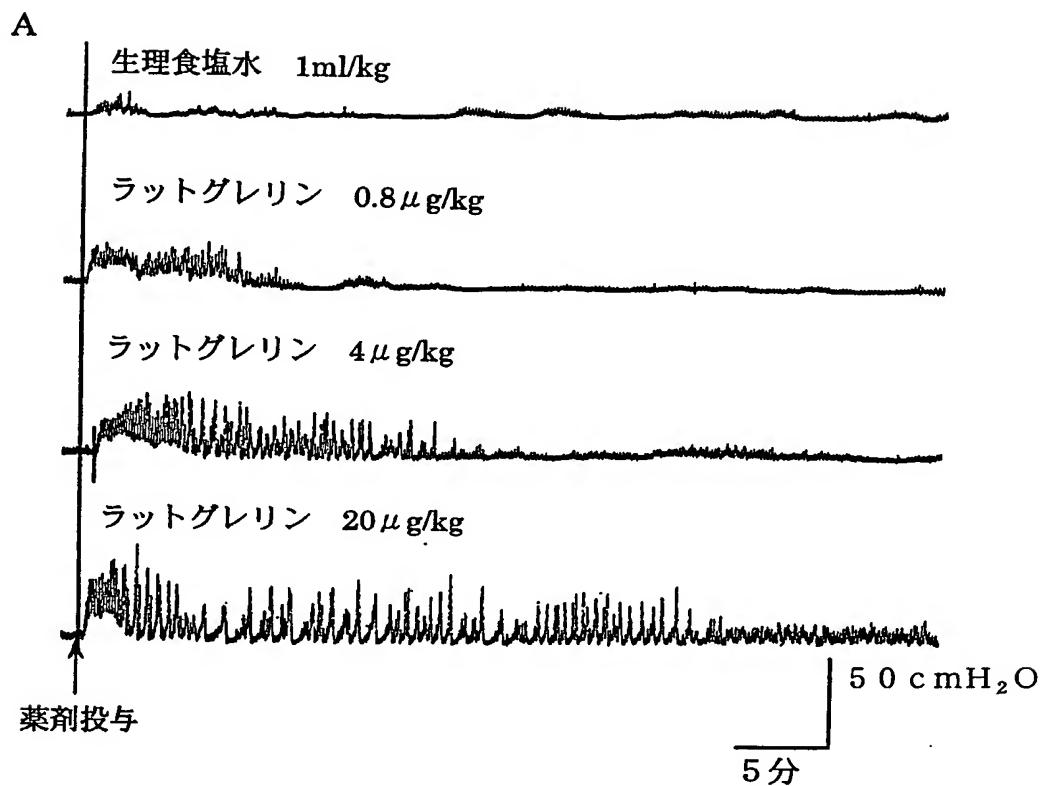
A



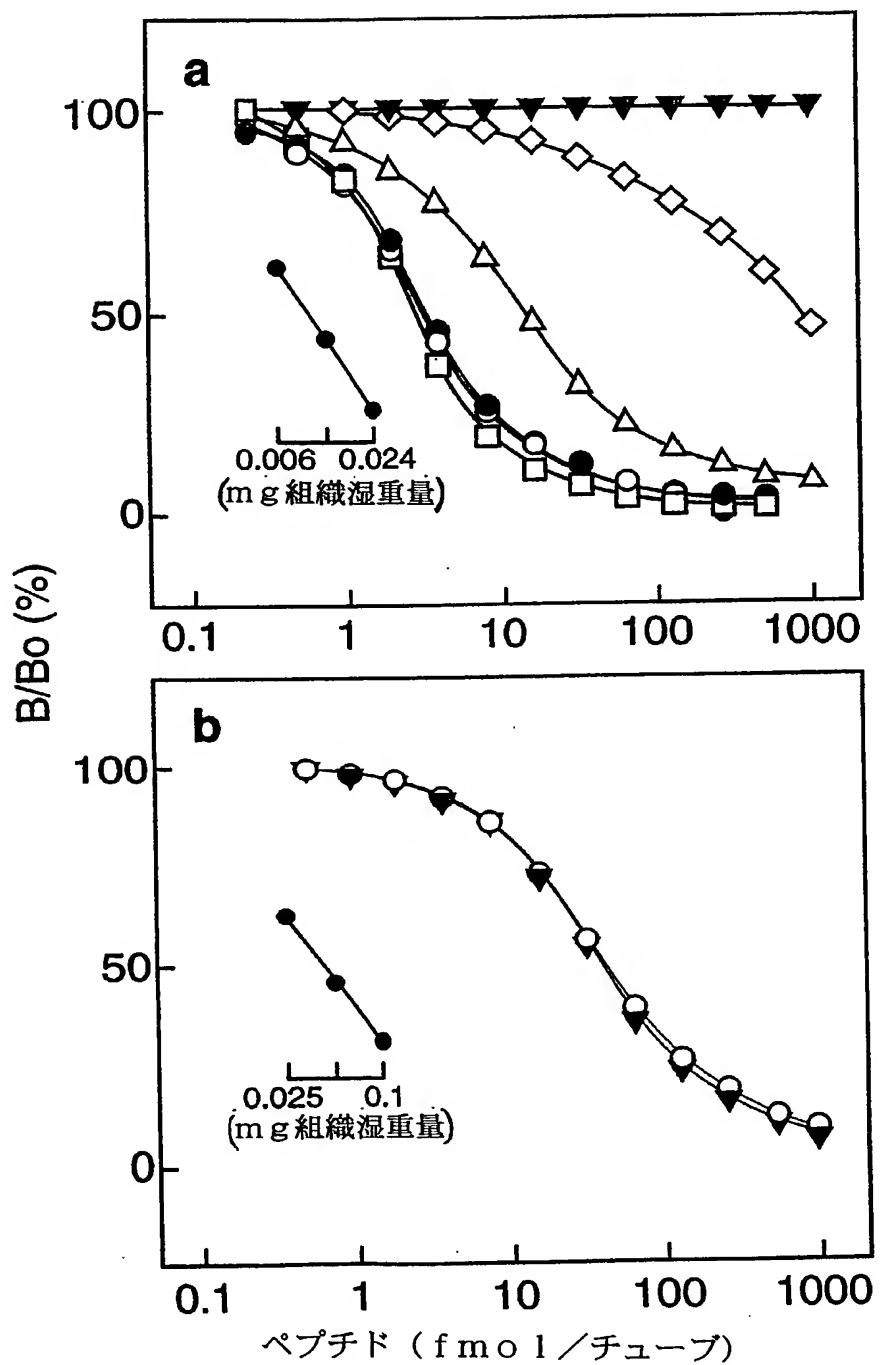
B



第8図



第9図



SEQUENCE LISTING

<110> Kangawa, Kenji

<120> New Peptides

<130> DS03F216

<150> JP 11-210002

<151> 1999-7-23

<150> JP 11-338841

<151> 1999-11-29

<150> JP 2000-126623

<151> 2000-4-26

<160> 39

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro

1

5

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<223> Amino acid sequence for rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 2

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys

1

5

10

15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Amino acid sequence for human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>3

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
1 5 10 . 15
Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 4

<211> 117

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<223> Amino acid sequence for a prepro-form of rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>4

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Met Leu
1 5 10 . 15
Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
20 25 30
Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
35 40 45
Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln
50 55 60
Ala Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe
65 70 75 . 80
Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg
85 90 95
Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu
100 105 110
Ala Pro Ala Asn Lys
115

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

10	15	20	
gca ggt tcc agc ttc ttg agc cca gag cac cag aaa gcc cag cag aga			144
Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg			
25	30	35	
aag gaa tcc aag aag cca cca gct aaa ctg cag cca cga gct ctg gaa			192
Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu Glu			
40	45	50	
ggc tgg ctc cac cca gag gac aga gga caa gca gaa gag gca gag gag			240
Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu			
55	60	65	70
gag ctg gaa atc agg ttc aat gct ccc ttc gat gtt ggc atc aag ctg			288
Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu			
75	80	85	
tca gga gct cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt			336
Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu			
90	95	100	
cag gat atc ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg cca gct aac aag			381
Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys			
105	110	115	
taaccactga caggactggc ccctgtactt tcctcctaag caagaactca catccagctt			441
ctgcctcc tcgcaactccc agcactctcc tgctgactta caaataatg ttcaagctgt			501
<210> 7			
<211> 511			
<212> DNA			
<220>			
<221> CDS			
<222> (34)...(384)			
<213> Homo sapiens			
<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of human endogenous peptides of growth hormone secretagogue			
<400>7			
gcaggccac ctgtctgcaa cccagctgag gcc atg ccc tcc cca			45
Met Pro Ser Pro			
1			
ggg acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg			93

Gly	Thr	Val	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Met	Leu	Trp	Leu	Asp	Leu	
5																20
gcc	atg	gca	ggc	tcc	agc	ttc	ctg	agc	cct	gaa	cac	cag	aga	gtc	cag	
Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Arg	Val	Gln	
25																35
cag	aga	aag	gag	tcg	aag	aag	cca	cca	gcc	aag	ctg	cag	ccc	cga	gct	
Gln	Arg	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln	Pro	Arg	Ala	
40																50
cta	gca	ggc	tgg	ctc	cgc	ccg	gaa	gat	gga	ggt	caa	gca	gaa	ggg	gca	
Leu	Ala	Gly	Trp	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Gly	Gly	Gln	Ala	Glu	Gly	Ala	
55																65
gag	gat	gaa	ctg	gaa	gtc	cgg	ttc	aac	gcc	ccc	ttt	gat	gtt	gga	atc	
Glu	Asp	Glu	Leu	Glu	Val	Arg	Phe	Asn	Ala	Pro	Phe	Asp	Val	Gly	Ile	
70																80
aag	ctg	tca	ggg	gtt	cag	tac	cag	cag	cac	agc	cag	gcc	ctg	ggg	aag	
Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Gln	Tyr	Gln	Gln	His	Ser	Gln	Ala	Leu	Gly	Lys	
85																100
ttt	ctt	cag	gac	atc	ctc	tgg	gaa	gag	gcc	aaa	gag	gcc	cca	gcc	gac	
Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Pro	Ala	Asp	
105																115
aag	tgtatcgccca	caagccttac	tcacccctct	ctaagtttag	aagcgctcat											434
Lys																
ctggcttttc	gctttgtttct	gcagcaactc	ccacgactgt	tgtacaagct	caggaggcga											494
ataaaatgttc	aaacttgt															511

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 8

Gly Ser Ser Phe

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 9

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln

1

5

10

<210> 10

<211> 27

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<223> Amino acid sequence for rat endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 10

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu

1

5

10

15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

<210> 11

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Amino acid sequence for human endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 11

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu

1

5

10

15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<223> Amino acid sequence for a prepro-form of rat endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 12

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Met Leu

1 5 10 15

Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His

20 25 30

Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln

35 40 45

Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala

50 55 60

Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp

65 70 75 80

Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala

85 90 95

Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala

100 105 110

Pro Ala Asn Lys

115

<210> 13

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Amino acid sequence for prepro-form of human endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 13

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Gly Met Leu

1 5 10 15

Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His

20 25 30

Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln

35 40 45

Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala

50	55	60													
Glu	Gly	Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Glu	Val	Arg	Phe	Asn	Ala	Pro	Phe	Asp
65			70			75			80						
Val	Gly	Ile	Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Gln	Tyr	Gln	Gln	His	Ser	Gln	Ala
			85			90			95						
Leu	Gly	Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala
				100		105			110						
Pro	Ala	Asp	Lys												
				115											

<210> 14

<211> 498

<212> cDNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (31)... (378)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rat endogenous peptides
(27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 14

tccagatcat	ctgtcctcac	caccaaggcc	atg	gtg	tct	tca	gct	act	48
------------	------------	------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----

Met	Val	Ser	Ser	Ala	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5
---	---

atc	tgc	agt	ttg	cta	ctc	ctc	agc	atg	ctc	tgg	atg	gac	atg	gcc	atg	96
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----

Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Leu	Trp	Met	Asp	Met	Ala	Met
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

10	15	20
----	----	----

gca	ggt	tcc	agc	ttc	ttg	agc	cca	gag	cac	cag	aaa	gcc	cag	aga	aag	144
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Lys	Ala	Gln	Arg	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

25	30	35
----	----	----

gaa	tcc	aag	aag	cca	cca	gct	aaa	ctg	cag	cca	cga	gct	ctg	gaa	ggc	192
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln	Pro	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

40	45	50
----	----	----

tgg	ctc	cac	cca	gag	gac	aga	gga	caa	gca	gaa	gag	gca	gag	gag	gag	240
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Trp	Leu	His	Pro	Glu	Asp	Arg	Gly	Gln	Ala	Glu	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

55	60	65	70
----	----	----	----

ctg	gaa	atc	agg	ttc	aat	gct	ccc	ttc	gat	gtt	ggc	atc	aag	ctg	tca	288
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

gat gaa ctg gaa gtc cgg ttc aac gcc ccc ttt gat gtt gga atc aag	285		
Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys			
70	75	80	
ctg tca ggg gtt cag tac cag cag cac agc cag gcc ctg ggg aag ttt	333		
Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys Phe			
85	90	95	100
ctt cag gac atc ctc tgg gaa gag gcc aaa gag gcc cca gcc gac aag	381		
Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp Lys			
105	110	115	
tgatcgccca caagccttac tcacctctct ctaagtttag aagcgctcat	431		
ctggcttttc gcttgcctct gcagcaaccc ccacgactgt tgtacaagct caggaggcga	491		
ataaatgttc aaacttgt	508		

<210> 16

<211> 28

<212> PRT

<213> Sus scrofa (pig)

<223> Amino acid sequence for porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 16

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys

1	5	10	15
Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg			
20	25		

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> Sus scrofa (pig)

<223> Amino acid sequence for porcine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 17

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu

1	5	10	15
Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg			

20

25

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Sus scrofa (pig)

<223> Amino acid sequence for prepro-form of porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 18

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu

1 5 10 15

Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu

20 25 30

His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys

35 40 45

Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser Gly

50 55 60

Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro

65 70 75 80

Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His Gly

85 90 95

Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr

100 105 110

Glu Ala Pro Ala Asp Lys

115

<210> 19

<211> 117

<212> PRT

<213> Sus scrofa (pig)

<223> Amino acid sequence for prepro-form of porcine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 19

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu

1 5 10 15

Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu

20	25	30
His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu		
35	40	45
Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser Gly Glu		
50	55	60
Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Cys		
65	70	75
Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His Gly Gln		
85	90	95
Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr Glu		
100	105	110
Ala Pro Ala Asp Lys		
115		

<210> 20		
<211> 494		
<212> DNA		
<220>		
<221> CDS		
<222> (9)... (362)		
<213> Sus scrofa (pig)		
<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue		
<400> 20		
ctgaggcc atg ccc tcc acg ggg acc att tgc agc ctg ctg ctc ctc 47		
Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu		
1	5	10
agc gtg ctc ctc atg gca gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttc ttg 95		
Ser Val Leu Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu		
15	20	25
agc ccc gaa cac cag aaa gtg cag cag aga aag gag tcc aag aag cca 143		
Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro		
30	35	40
gca gcc aaa ctg aag ccc cgg gcc ctg gaa ggc tgg ctc ggc cca gaa 191		
Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu		
50	55	60

gac	agt	ggt	gag	gtg	gaa	ggc	acg	gag	gac	aag	ctg	gaa	atc	cg	ttc	239
Asp	Ser	Gly	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Glu	Asp	Lys	Leu	Glu	Ile	Arg	Phe	
65							70						75			
aac	gcc	ccc	tgt	gat	gtt	ggg	atc	aag	ttg	tca	ggg	gct	cag	tcc	gac	287
Asn	Ala	Pro	Cys	Asp	Val	Gly	Ile	Lys	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Ser	Asp	
80							85						90			
cag	cac	ggc	cag	ccc	ctg	ggg	aaa	ttt	ctc	cag	gac	atc	ctc	tgg	gaa	335
Gln	His	Gly	Gln	Pro	Leu	Gly	Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu	
95							100					105				
gag	gtc	act	gag	gcc	ccg	gcc	gac	aag	tgattgtccc	tgagaccagc						382
Glu	Val	Thr	Glu	Ala	Pro	Ala	Asp	Lys								
110							115									
cacctctgtt ctcccaagcct cctaagggtt cacctggctt ccaggacgct tccactatca															442	
cacccagctc tgagggatgc tagcctggga ggtgaataaa cattcagact gg															494	
<210> 21																
<211> 491																
<212> DNA																
<220>																
<221> CDS																
<222> (9)... (359)																
<213> Sus scrofa (pig)																
<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of porcine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue																
<400> 21																
ctgaggccc atg ccc tcc acg ggg acc att tgc agc ctg ctg ctc ctc															47	
Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu																
1		5		10												
agc gtg ctc ctc atg gca gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttc ttg															95	
Ser Val Leu Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu																
15		20		25												
agc ccc gaa cac cag aaa gtg cag aga aag gag tcc aag aag cca gca															143	
Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala																
30		35		40		45										
gcc aaa ctg aag ccc cgg gcc ctg gaa ggc tgg ctc ggc cca gaa gac															191	

Ala Lys Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp			
50	55	60	
agt ggt gag gtg gaa ggc acg gag gac aag ctg gaa atc cgg ttc aac			239
Ser Gly Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn			
65	70	75	
gcc ccc tgt gat gtt ggg atc aag ttg tca ggg gct cag tcc gac cag			287
Ala Pro Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln			
80	85	90	
cac ggc cag ccc ctg ggg aaa ttt ctc cag gac atc ctc tgg gaa gag			335
His Gly Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu			
95	100	105	
gtc act gag gcc ccg gcc gac aag tgattgtccc tgagaccagc			379
Val Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys			
110	115		
cacctctgtt ctcccagcct cctaaggctt cacctggctt ccaggacgct tccactatca			439
cacccagctc tgagggatgc tagccatggaa ggtaataaaa cattcagact gg			491

<210> 22

<211> 27

<212> PRT

<213> Bos taurus

<223> Amino acid sequence for bovine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 22

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu Leu Gln Arg Lys Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg

20	25
----	----

<210> 23

<211> 89

<212> PRT

<213> Bos taurus

<223> Partial amino acid sequence for a prepro-form of bovine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 23

Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu
 1 5 10 15
 Leu Gln Arg Lys Glu Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg
 20 25 30
 Thr Leu Glu Gly Gln Phe Asp Phe Glu Val Gly Ser Gln Ala Glu Gly
 35 40 45
 Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Phe Phe Asn Ile Gly
 50 55 60
 Ile Lys Leu Ala Gly Ala Gln Ser Leu Gln His Gly Gln Thr Leu Gly
 65 70 75 80
 Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu
 85

<210> 24

<211> 267

<212> DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (267)

<213> Bos taurus

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of bovine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 24

gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttt ctg agc ccc gaa cat cag gaa 48
 Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu
 1 5 10 15
 ctg cag aga aag gaa gct aag aag cca tca ggc aga ctg aag ccc cgg 96
 Leu Gln Arg Lys Glu Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg
 20 25 30
 acc ctg gaa ggc cag ttt gac ccg gag gtg gga agt cag gcg gaa ggt 144
 Thr Leu Glu Gly Gln Phe Asp Phe Glu Val Gly Ser Gln Ala Glu Gly
 35 40 45
 gca gag gac gag ctg gaa atc cgg ttc aac gcc ccc ttt aac att ggg 192
 Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Phe Phe Asn Ile Gly
 50 55 60

atc aag cta gca ggg gct cag tcc ctc cag cat ggc cag acg ttg ggg 240
Ile Lys Leu Ala Gly Ala Gln Ser Leu Gln His Gly Gln Thr Leu Gly
65 70 75 80
aag ttt ctt cag gac atc ctc tgg gaa 267
Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu
85

<210> 25

<211> 24

<212> PRT

<213> Gallus domesticus

<223> Amino acid sequence for chicken endogenous peptides of growth hormone
secretagogue

<400> 25

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys

1 5 10 15

Gly Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg

20

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> Anguilla japonica

<220>

<221> AMIDATION

<222> 21

<223> Amino acid sequence for eel endogenous peptides of growth hormone
secretagogue

<400> 26

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys

1 5 10 15

Lys Pro Pro Arg Val

20

<210> 27

<211> 28

<212> PRT

<213> Rana cafesbeiana

<223> Amino acid sequence for frog endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 27

Gly Leu Ser Phe Leu Ser Pro Ala Glu Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg

1 5 10 15

Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met Arg

20 25

<210> 28

<211> 27

<212> PRT

<213> Xenopus laevis

<223> Amino acid sequence for frog (Xenopus laevis) endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 28

Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg

1 5 10 15

Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met

20 25

<210> 29

<211> 23

<212> PRT

<213> Oncorhynchus mykiss

<220>

<221>AMIDATION

<222> 23

<223> Amino acid sequence for rainbow trout endogenous peptides (23 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 29

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Val Arg Gln Gly

1 5 10 15

Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val

20

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<220>

<221> AMIDATION

<222> 20

<223> Amino acid sequence for rainbow trout endogenous peptides (20 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 30

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly Lys

1

5

10

15

Pro Pro Arg Val

20

<210> 31

<211> 28

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<223> Amino acid sequence for dog endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 31

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys

1

5

10

15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> *Anguilla japonica*

<223> Amino acid sequence for prepro-form of eel endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 32

Met Lys Arg Thr Ala Tyr Ile Ile Leu Leu Val Cys Val Leu Ala Leu

1	5	10	15
Trp	Met	Asp	Ser
Val	Gln	Ala	Gly
Ser	Ser	Phe	Leu
Pro	Ser	Pro	Gln
20	25	30	
Arg	Pro	Gln	Gly
Lys	Asp	Lys	Lys
Pro	Pro	Arg	Val
Arg	Arg	Gly	Arg
Asp			Asp
Ser	Asp	Gly	Ile
Ile	Leu	Asp	Leu
Phe	Met	Arg	Pro
Pro	Leu	Gln	Asp
50	55	60	Glu
Asp	Ile	Arg	His
Ile	Thr	Phe	Asn
Thr	Pro	Phe	Thr
Glu	Ile	Gly	Ile
65	70	75	Thr
Met	Thr	Glu	Glu
Glu	Leu	Phe	Gln
Tyr	Gln	Gly	Glu
90			Val
Met	Asn	Asp	Met
Gln	Leu	Leu	Asp
Asp	Thr	Pro	Ala
100	105		Lys
			Glu

<210> 33

<211> 114

<212> PRT

<213> Xenopus laevis

<223> Amino acid sequence frog (Xenopus laevis) endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>33

1	5	10	15
Met	Asn	Phe	Gly
Ala	Ala	Ile	Phe
Ile	Phe	Gly	Val
Val	Val	Leu	Phe
Leu	Leu	Cys	Leu
Trp	Trp	Thr	Gly
Gly	Gly	Ala	Gln
Ala	Gln	Gly	Leu
Thr	Leu	Thr	Phe
Phe	Leu	Ser	Pro
Asp	Asp	Asp	Ala
Met	Gln	Lys	Ile
Gln	Ile	Ala	Glu
Ile	Glu	Arg	Gln
Gly	Gln	Ser	Gln
Asn	Asn	Gly	Asn
Asn	Asn	Arg	Asn
Arg	Arg	Gly	Asp
Gly	Asn	Val	Asp
Asn	Asn	Glu	Asp
Arg	Asn	Asp	Leu
Asp	Asn	Leu	Ala
Leu	Asn	Gly	Glu
Ala	Asn	Arg	Glu
Asp	Asn	Val	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Leu	Asn	Asp	Leu
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn	Leu	Asp
Asp	Asn	Gly	Asp
Leu	Asn	Arg	Asp
Asp	Asn	Asp	Leu
Leu	Asn</td		

<210> 34

<211> 82

<212> PRT

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<223> Amino acid sequence for prepro-form of rainbow trout endogenous peptides (23 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400>34

Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala Lys Ser Val Ser

1 5 10 15

Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Val Arg Gln

20 25 30

Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu Ser Phe

35 40 45

Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn Thr

50 55 60

Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu Phe

65 70 75 80

Gln Glu

<210> 35

<211> 99

<212> PRT

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<223> Amino acid sequence for prepro-form of rainbow trout endogenous peptides (20 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400>35

Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala Lys Ser Val Ser

1 5 10 15

Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly

20 25 30

Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu Ser Phe Ala Glu Leu

35 40 45

Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn Thr Ile Lys Ala

50 55 60

Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu Phe Gln Glu Tyr

65	70	75	80	
Gly	Ala	Val	Leu	
Gln	Lys	Ile	Leu	
		Gln	Asp	
		Val	Leu	
		Gly	Asp	
		Thr	Ala	
		85	90	95
Thr	Ala	Glu		

<210> 36

<211> 503

<212> DNA

<220>

<221> CDS

<222> (66)... (389)

<213> *Anguilla japonica*

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of eel endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 36

tccaaaggc actgggtttc ctcttaaagt gcaaaactcc actgtgagct tcagacatga 60

ggcag atg aaa cgc acc gca tac atc atc ctg ctg gtc tgc gtc ctg 107

Met Lys Arg Thr Ala Tyr Ile Ile Leu Leu Val Cys Val Leu

1	5	10
---	---	----

gcg ctg tgg atg gac tct gtc cag gct ggc tcc agc ttc ctc agc ccc 155

Ala Leu Trp Met Asp Ser Val Gln Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro

15	20	25	30
----	----	----	----

tca cag aga ccg cag ggg aag gat aag aag cct ccc agg gtt ggc aga 203

Ser Gln Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg

35	40	45
----	----	----

cga gac tca gat ggg atc ctg gac ctg ttt atg agg ccc cca ttg cag 251

Arg Asp Ser Asp Gly Ile Leu Asp Leu Phe Met Arg Pro Pro Leu Gln

50	55	60
----	----	----

gat gaa gac atc aga cac att acg ttt aac act cct ttt gag atc ggg 299

Asp Glu Asp Ile Arg His Ile Thr Phe Asn Thr Pro Phe Glu Ile Gly

65	70	75
----	----	----

atc acc atg act gag gag ctg ttc cag caa tat gga gaa gtg atg cag 347

Ile Thr Met Thr Glu Glu Leu Phe Gln Gln Tyr Gly Glu Val Met Gln

80	85	90
----	----	----

aag atc atg cag gat ttg ctg atg gac aca cct gcc aaa gag 389

Lys Ile Met Gln Asp Leu Leu Met Asp Thr Pro Ala Lys Glu
 95 100 105
 tgacaagagt ggatatgate tggacttcat aaaacccatgc gtcccatata ttcctgcatt 449
 attgcatca taattcaacc aattgttaaa catttaataa aattttgcaa acgc 503

<210> 37
 <211> 484
 <212> DNA
 <220>
 <221> CDS
 <222> (47)... (388)
 <213> Xenopus laevis
 <223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of frog
 (Xenopus laevis) endogenous peptides of growth hormone
 secretagogue
 <400> 37
 tttcactttt atctcgagg cggcacccgtt gaccaggacc ttcagg 46

atg aat ttt ggt aaa gcc gcc atc ttt ggg gtt gtc ttg ttc tgc ctg 94
 Met Asn Phe Gly Lys Ala Ala Ile Phe Gly Val Val Leu Phe Cys Leu
 1 5 10 15
 ctg tgg acg gag ggg gcc cag gct ggc ttg acc ttc ctg agt cca gcc 142
 Leu Trp Thr Glu Gly Ala Gln Ala Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala
 20 25 30
 gac atg cag aag att gcg gag agg caa tca cag aat aag ctg aga cac 190
 Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His
 35 40 45
 ggc aat atg aat cgc agg ggt gtg gag gat gac ctg gcc ggg gag gag 238
 Gly Asn Met Asn Arg Arg Gly Val Glu Asp Asp Leu Ala Gly Glu Glu
 50 55 60
 atc ggg gtg acc ttc cct ctg gat atg aag atg acg cag gag cag ttc 286
 Ile Gly Val Thr Phe Pro Leu Asp Met Lys Met Thr Gln Glu Gln Phe
 65 70 75 80
 cag aag cag agg gct gcg gtg cag gac ttc ctg tac tcc tcc ctc ctc 334
 Gln Lys Gln Arg Ala Ala Val Gln Asp Phe Leu Tyr Ser Ser Leu Leu
 85 90 95

tct ctc ggg tca gtg cag gat aca gaa gac aag aat gaa aat cct cag	382
Ser Leu Gly Ser Val Gln Asp Thr Glu Asp Lys Asn Glu Asn Pro Gln	
100 105 110	
agc caa tgagaatgtat gaaaatccgc tcgtctctga tgccctcccc cgatctgtgt	438
Ser Gln	
 gtctttatata tctctgtgtat acccagaaat aaatcttatt tatggc	484
 <210> 38	
<211> 462	
<212> DNA	
<220>	
<221> CDS	
<222> (12)... (257)	
<213> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	
<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rainbow trout endogenous peptides (23 amino acids) of growth hormone secretagogue	
<400> 38	
tcacaggctct c atg ata ctg atg ctg tgt act ctg gct ctg tgg gcc	47
Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala	
1 5 10	
aag tca gtc agt gct ggc tcc agc ttc ctc agc ccc tcc cag aaa cca	95
Lys Ser Val Ser Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro	
15 20 25	
cag gta aga cag ggt aaa ggg aag ccc cct cga gtt ggt cgg cga gac	143
Gln Val Arg Gln Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp	
30 35 40	
att gag agc ttt gct gag ctg ttt gag ggt ccc ctt cac cag gaa gac	191
Ile Glu Ser Phe Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp	
45 50 55 60	
aaa cac aat acg atc aag gct cct ttt gag atg ggc atc acc atg agt	239
Lys His Asn Thr Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser	
65 70 75	
gag gag gag ttc cag gag tatggtgccg tgctgcagaa gatcctgcag	287
Glu Glu Glu Phe Gln Glu	

gacgtccctgg gagacacitgc cactgcagaa tgcataacaac ttggcataga cacgaaatac	347
aaagaacctc cattccctgt tctccaaactt tccttctca acttgtctta tacccaatgt	407
actgtgtgaa catcgtttga attgtaaaag atgaataaaa taaccgcggc cgcta	462
<210> 39	
<211> 453	
<212> DNA	
<220>	
<221> CDS	
<222> (12)... (308)	
<213> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	
<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rainbow trout endogenous peptides (20 amino acids) of growth hormone secretagogue	
<400> 39	
tcacagggtct c atg ata ctg atg ctg tgt act ctg gct ctg tgg gcc	47
Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala	
1 5 10	
aag tca gtc agt gct ggc tcc agc ttc ctc agc ccc tcc cag aaa cca	95
Lys Ser Val Ser Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro	
15 20 25	
cag ggt aaa ggg aag ccc cct cga gtt ggt cgg cga gac att gag agc	143
Gln Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu Ser	
30 35 40	
ttt gct gag ctg ttt gag ggt ccc ctt cac cag gaa gac aaa cac aat	191
Phe Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn	
45 50 55 60	
acg atc aag gct cct ttt gag atg ggc atc acc atg agt gag gag gag	239
Thr Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu	
65 70 75	
ttc cag gag tat ggt gcc gtg ctg cag aag atc ctg cag gac gtc ctg	287
Phe Gln Glu Tyr Gly Ala Val Leu Gln Lys Ile Leu Gln Asp Val Leu	
80 85 90	
gga gac act gcc act gca gaa tgcataacaac ttggcataga cacgaaatac	338
Gly Asp Thr Ala Thr Ala Glu	
95	
aaagaacctc cattccctgt tctccaaactt tccttctca acttgtctta tacccaatgt	398

25/25

actgttgtaa catcgtttga attgtaaaag atgaataaaa taacactgct tcctt 453

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04907

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K16/18, A61K38/18, A61P5/06, A61P19/08, A61K45/00, A61K48/00, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K16/18, A61K38/18, A61P5/06, A61P19/08, A61K45/00, A61K48/00, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/42840, A1 (ZYMOGENETICS, INC.), 01 October, 1998 (01.10.98), p.19, pp.54-58 & AU, 9865769, A & NO, 9904614, A & EP, 975760, A1 & BR, 9808059, A & CN, 1254375, A	1-32,40-53
X	BLUET-PAJOT, M-T. et al., "Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion", Cellular and Molecular Neurobiology (1998), Vol.18, No.1 pp.101-104, p.109	1,5,33-36, 39,54,56
P,X	KOJIMA, M. et al., "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach", NATURE (Dec.1999), Vol.402, No.9, pp.656-660	1-36,39-54, 56
P,X	HOSODA, H. et al., "Purification and characterization of rat des-Gln ¹⁴ -Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor", J. Biol. Chem. (MAY, 2000), Vol.275, No.29, pp.21995-22000	1-36,39-54, 56
P,X	WO, 99/63088, A2 (GENENTECH, INC.),	1-32,40-53

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
17 October, 2000 (17.10.00)

Date of mailing of the international search report
24 October, 2000 (24.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04907

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	09 December, 1999 (09.12.99), & AU, 9943286	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04907

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 37-39,55,57
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 37, 38, 55 and 57 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int C1' C07K14/47, C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K16/18, A61K38/18, A61P5/06, A61P19/08, A61K45/00, A61K48/00, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int C1' C07K14/47, C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K16/18, A61K38/18, A61P5/06, A61P19/08, A61K45/00, A61K48/00, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, CA(STN), REGISTRY(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/42840, A1 (ZYMOGENETICS, INC.) 1. 10月. 1998 (01. 10. 98) p. 19, p54-58 &AU, 9865769, A &NO, 9904614, A &EP, 975760, A1 &BR, 9808059, A &CN, 1254375, A	1-32, 40-53
X	BLUET-PAJOT, M-T. et al. "Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion", Cellular and Molecular Neurobiology (1998) 第18巻, 第1号 p. 101-104, 109	1, 5, 33-36, 39, 54, 56

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 17. 10. 00	国際調査報告の発送日 24.10.00		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 六笠 紀子 印	4 B	9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	KOJIMA, M. et al. "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach", NATURE (Dec. 1999) 第402巻, 第9号 p. 656-660	1-36, 39-54, 56
P, X	HOSODA, H. et al. "Purification and characterization of rat des-Gln ¹⁴ -Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor", J. Biol. Chem. (MAY, 2000) 第275巻, 第29号 p. 21995-22000	1-36, 39-54, 56
P, X	WO, 99/63088, A2 (GENENTECH, INC.) 9. 12月. 1999 (09. 12. 99) &AU, 9943286	1-32, 40-53

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 37, 38, 55, 57 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
 請求の範囲37、38、55及び57は、人の身体の治療による処置方法であるから、
 この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。